



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias

**Represión de la respuesta a Jasmonatos:
el complejo JAZ/NINJA/TOPOLESS**

TESIS DOCTORAL

Gemma Fernández Barbero

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias

**Represión de la respuesta a Jasmonatos:
el complejo JAZ/NINJA/TOPLESS**

TESIS DOCTORAL

Gemma Fernández Barbero

DIRECTOR

Roberto Solano Tavira

Madrid, 2015



Represión de la respuesta a Jasmonatos: el complejo JAZ/NINJA/TOPLESS

Memoria presentada para optar al grado de
Doctor en Ciencias por:

Gemma Fernández Barbero

Universidad Autónoma de Madrid

Septiembre 2015

Vº Bº del Tutor de Tesis:

Vº Bº del Director de Tesis:

Dr. César de Haro

Dr. Roberto Solano Tavira

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización de esta tesis. En especial al Dr. Roberto Solano, director de esta investigación, por ofrecerme la oportunidad de realizar este trabajo, por su orientación, esfuerzo y dedicación en el desarrollo del mismo, pero sobre todo gracias por enseñarme a amar la ciencia y a poner ilusión y motivación en todos los proyectos que empezaba, por su apoyo constante a todos los niveles, científicos o meramente personales, por la confianza recibida a lo largo de estos años, demostrándome día a día que los buenos jefes no sólo son inteligentes sino grandes personas. Por todo ello, muchas gracias.

Quisiera agradecer también el apoyo en la elaboración de esta tesis de todas las personas que han formado y forman parte del laboratorio 317 y el servicio de Genómica. En especial a Gloria, por enseñarme lo importante que es ponerle positividad a la ciencia y a la vida en general, por contagiarme su fuerza y energía, por apoyarme incondicionalmente. A Andrea Chini, por sus consejos en temas genéticos, por tener siempre ideas brillantes y compartirlas, por su trato amable y sacar siempre tiempo para ayudarme. A José Manuel Chico, porque trabajar con él siempre es fluido y fácil, por su apoyo constante. A Sandra Fonseca, por enseñarme que la capacidad de lucha y constancia en ciencia son muy importantes, que los experimentos hay que lucharlos, que nunca salen a la primera, pero que acaban saliendo si le pones esfuerzo. A Marta Boter, por enseñarme a trabajar con mentalidad inglesa. A Selena, por mostrarme que en el caos también se encuentra la genialidad. A Isa, porque veo en ella la ilusión que nunca se debe de perder cuando trabajas en ciencia, por su apoyo incondicional, sus mensajes de ánimo, y todas esas pequeñas cosas que la hacen grande a mis ojos aunque sólo sea un “piojo”. A Guille, que me ayuda en la lucha contra el caos con su orden y método, y sobre todo por hacerme reír, que también es importante. A Andrés, por nuestras charlas mañaneras compartiendo ciencia o cualquier otra cosa que se nos pase por la cabeza. A Marta Godoy, por sus enseñanzas eficientes en mi primera toma de contacto con el mundo de los *microarrays*. Y a todos lo que ya no forman parte del laboratorio pero que también participaron en mi aprendizaje científico y personal. En especial a Julián por enseñarme con firmeza pero con enorme efectividad en mis inicios “cnberos”, a Romel por su eterna sonrisa y compañerismo, a Maarja por contagiarme su vitalidad, a Mónica por su fuerza y simpatía, a Bruce, Govi, Miki... Gracias infinitas a todos ellos que tan

buenos momentos me han hecho vivir dentro y fuera del laboratorio, El “317 Power” siempre en mi mente, con las salidas montaÑeras con Rober, los días de escalada, las canoas, las fiestas nocturnas (vale, esas yo no tanto...), mis fiestas de cumpleaños con barbacoa y empanada porque es lo único que sé hacer, las salidas de esquí, la fiesta de mi boda... Muchas gracias a todos por vuestra ayuda, por vuestros ánimos al final de este trabajo, por apoyarme y hacerme sentir que merece la pena trabajar con personas tan especiales.

También quisiera extender mi agradecimiento a todas las personas del departamento de Genética Molecular de Plantas y CNB que durante todos estos años me han prestado su ayuda, haciendo mucho más fácil la realización de esta tesis. Gracias también al eficiente servicio de cultivo *in vitro*, personal de invernadero, almacén, esterilización y servicio de Genómica.

Son muchos los recuerdos y buenos momentos personales que guardo también: En especial, no puedo olvidar los cafés al sol con Juani y Mic, el gabacho “tirafresas”, que cocina los mejores bizcochos de “la motivación” del mundo y siempre estuvo pendiente de la españolita “Gemminita”. A Maite, por esa motivación constante para que escribiera la tesis. A Andrea Volante por esas charlas dramáticas en la oscuridad mientras revelábamos los *western* que no nos salían y por su compañía virtual en nuestras noches de insomnio. A los “adolescentes” (Laura Cuyàs, Elisa, Eduard, Stella...) de la tercera planta, que me acogieron entre sus filas a pesar de ser su “abuela” y me hicieron disfrutar de muchos buenos momentos. A Marco Taurino, con el que empecé a hacer esta tesis, por ser mi amigo más fiel y más querido, por motivarme a terminar lo que juntos empezamos, por saber sacar lo mejor de mí, porque siempre está conmigo aunque ya no esté por los pasillos.

No podría olvidar a mis amigas del cole, que siempre han apoyado el trabajo de “Jasmonata”, que sin saber muy bien a lo que me dedicaba, me han motivado siempre ha terminarlo.

Finalmente y de forma especial quisiera agradecer el apoyo de mi familia, pues sin ella esto no hubiera sido posible. Gracias a mis padres, Eduardo y Angelines, y mi hermano Dudi, que siempre han estado a mi lado, contagiándose de mi amor por la biología y

escuchando mis charlas infernales desde que era niña sobre biología, ya fuera sobre animales, las “proteínas” del pelo o las hojas de las palmeras. Gracias por sacar siempre lo mejor de mí, empujándome a conseguir este sueño que comenzó hace muchos años. No puedo olvidar a Mimi y Orión, mis animales queridos, que nunca sabrán que escribí estas palabras, pero que me han acompañado fieles en las noches de escritura. Y un gracias infinito a Rober, mi querido compañero de viaje, que desde que le conocí me contagió su amor por la vida, las montañas y la ciencia. Gracias por hacerme reír y disfrutar aún cuando las cosas se torcían, por ser positivo y vital, por darme fuerzas para continuar cuando abandonar hubiera sido lo más fácil, por aguantar mis “locuras”, por apoyarme y defenderme en todo momento, por este fuerza final que ha hecho posible que ahora esté escribiendo esto, y sobre todo, por darme a Diego, “latiditos”..., mi querido niño, que me hace feliz y cambió mi vida...Gracias.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética Molecular de Plantas del Centro Nacional de Biotecnología-CSIC y ha sido financiado por diversos proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad.

Abreviaturas

AB: ácido abscísico

AD: dominio de activación de la transcripción de GAL4, *activation domain*

Ade: adenina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADN-T: inserción de ADN

amiARN: *artificial micro ARN*

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ARN ribosómico

ATP: adenosín trifosfato

BD: dominio de unión a ADN de GAL4, *inding domain*

bHLH: *basic helix loop helix*

Col: Columbia

COR: coronatina

DMF: dimetil formamida

ET: etileno

FLAG: epítipo DYKDDDDK

FT: factor de transcripción

GA: giberelina

GFP: proteína fluorescente verde procedente de *Aequorea victoria*

GUS: gen/actividad β -glucuronidasa bacteriana

HA: epítipo de la hemaglutinina (YPYDVPDYA)

His: histidina

JA: ácido jasmónico

JA-Ile: jasmonoyl-isoleucina

JAs: jasmonatos

JAZ: *Jasmonate ZIM-domain protein*

Leu: leucina

MBP: *Maltose-Binding-Protein*

OD: densidad óptica

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PD: *Pull-Down* de proteína

PDF1.2: gen de la defensina, *plant defensin*

Pi: ortofosfato inorgánico

PMSF: fluoruro de fenil-metil-sulfonilo

PSB-D: línea celular de *Arabidopsis thaliana*

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

SA: ácido salicílico

SDS: dodecil sulfato sódico

Trp: triptófano

TPL: proteína *topless*

TPR2: proteína *topless related 2*

TPR3: proteína *topless related 3*

VSP2: *vegetative storage 2 protein*

WB: ensayo *Western blot*

WT: plantas de genotipo silvestre

A Diego

ÍNDICE

Summary	27
Resumen	31
1. INTRODUCCIÓN	35
1.1. El ácido jasmónico y los jasmonatos	37
1.1.1. Metabolismo del JA	37
1.1.1.1. Biosíntesis de JA	37
1.1.1.2. Catabolismo de JA	41
1.2. Funciones de los JAs	41
1.2.1. Defensa	41
1.2.1.1. Patógenos	42
1.2.1.2. Herbívoros	43
1.2.2. Desarrollo	44
1.3. Señalización de JA	44
1.3.1. SCFCOI1	44
1.3.1.1. Vía ubiquitin-proteasoma 26S	46
1.3.2. Factores de transcripción	47
1.3.2.1. MYC2	48
1.3.2.2. MYC3, MYC4 y MYC5	51
1.3.2.3. bHLH003, bHLH013 y bHLH017	52
1.3.2.4. Otros factores <i>cis</i> y <i>trans</i>	52
1.4. Antecedentes en el laboratorio	53
1.4.1. Identificación de <i>JAI3/JAZ3</i>	53
2. OBJETIVOS	59
3. RESULTADOS	63
3.1. La familia de proteínas JAZ y su función represora en la vía de JA	65
3.1.1. Caracterización molecular de JAZ3 y otras proteínas JAZ	65
3.1.1.1. Interacción JAZ3/COI1	65
3.1.1.2. Interacción de otras proteínas de la familia JAZ con COI1	66
3.1.1.3. Degradación de JAZ3 por el proteasoma	66
3.1.1.4. Redundancia entre los miembros de la familia JAZ	70
3.1.1.5. Importancia del dominio JAS en la degradación de los JAZ	71
3.1.1.5.1. Análisis fenotípico de las líneas JAZΔJas	72

3.1.2. JAR1 y su función en la producción de la hormona bioactiva	74
3.1.3. JAZ3 relaciona el complejo SCF ^{COI} con la activación transcripcional inducida por JA	75
3.1.3.1. Las proteínas JAZ interaccionan con el FT MYC2	75
3.1.3.1.1. Mapeo de la región de interacción de JAZ3 y MYC2	76
3.1.3.2. Interacción de las proteínas JAZ con los FT MYC3 y MYC4	77
3.1.3.3. JAZ3 como regulador negativo de la función de MYC2	78
3.1.3.4. Regulación de los genes de la familia JAZ por MYC2	80
3.2. NINJA es diana de los represores JAZ y está implicado en la modulación de la respuesta a JA	80
3.2.1. Búsqueda de nuevos componentes de la vía de señalización de JA	80
3.2.1.1. Screening en levaduras usando como cebo JAZ3	80
3.2.1.2. TAP-tagging usando como cebo JAZ1, JAZ3, JAZ5 y JAZ7	85
3.2.2. Caracterización molecular de la proteína NINJA	87
3.2.2.1. Localización subcelular y estabilidad de la proteína NINJA	87
3.2.2.2. Mapeo de los dominios proteicos de interacción de NINJA con las proteínas de la familia JAZ	90
3.2.2.3. Caracterización fenotípica de las líneas de sobre-expresión de NINJA en respuesta a JA: inhibición del crecimiento de la raíz y medidas de antocianinas.	95
3.2.2.4. Caracterización fenotípica de las líneas de pérdida de función de NINJA en respuesta a JA	98
3.2.2.4.1. Inhibición del crecimiento de la raíz y acumulación de antocianinas mediada por JA	98
3.2.2.4.2. Análisis transcriptómico de las líneas de pérdida de función de NINJA	100
3.2.2.5. Búsqueda de nuevos interactores de NINJA: TOPLESS	101
3.2.2.5.1. Caracterización fenotípica del mutante <i>tpl-1</i>	104
3.2.2.6. Caracterización de NINJA como represor transcripcional	106

3.3. Modelos de co-represión alternativos al descrito para el tándem NINJA-TPL-JAZ	107
3.3.1. Motivo de represión EAR en la familia de proteínas JAZs	107
3.3.2. JAZ5 y JAZ6 son dianas directas de TOPLESS	108
3.3.2.1. Dominio de interacción de JAZ5 y JAZ6 con el co-represor TOPLESS : Dominio EAR	110
3.3.2.2. Caracterización fenotípica de los mutantes de pérdida y ganancia de función en los genes <i>JAZ5</i> y <i>JAZ6</i>	114
3.3.2.2.1. Inhibición del crecimiento de la raíz mediada por JA y COR	115
3.3.2.2.2. Peso fresco	116
3.3.2.2.3. Infección por <i>Botrytis cinerea</i>	117
3.3.2.2.4. Acumulación de antocianinas mediada por JA y COR	119
3.3.3. Interactores adicionales de TPL: otros posibles mecanismos de represión	119
4. DISCUSIÓN	121
4.1. La familia de represores JAZ	123
4.2. El complejo represor NINJA-TOPLESS	127
4.3. Mecanismos alternativos de represión: las proteínas JAZ5 y JAZ6	132
5. CONCLUSIONES	135
6. MATERIALES Y MÉTODOS	139
6.1. Cultivos vegetales	141
6.1.1. Material vegetal	141
6.1.2. Condiciones de crecimiento de <i>Arabidopsis</i>	141
6.1.2.1. <i>In vitro</i>	141
6.1.2.2. En sustrato	142
6.1.3. Cruzamientos en <i>Arabidopsis</i>	142
6.1.4. Transformación de <i>Arabidopsis</i>	142
6.1.5. Análisis fenotípico de plántulas de <i>Arabidopsis</i>	143

6.1.5.1. Ensayos de inhibición del crecimiento de la raíz	143
6.1.5.2. Extracción y cuantificación de antocianinas	143
6.2. Plásmidos	143
6.3. Ensayos microbiológicos	144
6.3.1. Cultivos bacterianos	144
6.3.1.1. Cepas	144
6.3.1.2. Método de crecimiento	144
6.3.1.3. Transformación	144
6.3.1.3.1. <i>E.coli</i>	144
6.3.1.3.2. <i>A.tumefaciens</i>	145
6.3.2. Cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>S. cerevisiae</i>)	145
6.3.2.1. Cepas	145
6.3.2.2. Métodos de cultivo	145
6.4. Manipulación de ácidos nucleicos	146
6.4.1. ADN	146
6.4.1.1. Purificación de ADN plasmídico	146
6.4.1.1.1. <i>E.coli</i>	146
6.4.1.1.2. <i>S. cerevisiae</i>	146
6.4.1.2. Purificación de ADN genómico total	146
6.4.1.3. Amplificación y purificación de ADN	148
6.4.1.4. Tratamiento enzimático del ADN	148
6.4.1.5. Determinación de la secuencia del ADN	148
6.4.1.6. Análisis de secuencias de ADN	148
6.4.1.7. Análisis de promotores y secuencias	148
6.4.2. ARN	148
6.4.2.1 Purificación de ARN total	148
6.4.2.2. Hibridación tipo <i>northern</i>	149
6.4.2.3. Síntesis de sondas radiactivas	149
6.4.2.4. RT-PCR cuantitativa	149
6.5. Análisis transcriptómico mediante hibridación con <i>microarrays</i>	150
6.6. Generación de plantas transgénicas	151
6.7. Análisis de proteínas	152
6.7.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes	152

6.7.2. Ensayos de <i>Pull-Down</i> (PD)	153
6.7.3. Ensayos de <i>Western Blot</i> (WB)	154
6.7.4. Ensayos de degradación de proteínas <i>in vitro</i>	154
6.7.5. Ensayos de unión de proteínas a ADN y retardo en gel (EMSA)	155
6.7.6. Purificación en tándem de complejos protéicos: TAP- <i>tagging</i>	157
6.7.7. Expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i> y co-inmunoprecipitación	157
6.8. Ensayos de dos híbridos en levaduras	157
6.8.1. Cribado en levaduras	158
6.8.1.1. Ensayo de β -galactosidasa	159
6.8.2. Ensayos de doble híbrido en levaduras	159
6.9. Microscopía	160
6.9.1. Microscopía confocal para visualización de GFP	160
6.9.2. Microscopía óptica para visualización de GFP	160
6.10. Análisis de expresión transitoria en protoplastos	161
6.11. Oligonucleótidos utilizados	161
 7. BIBLIOGRAFÍA	 165
 8. APÉNDICE	 191
8.1. Figuras suplementarias.	
1.a. Representación filogenética de las proteínas de la familia JAZ.	193
1.b. Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de los JAZs.	193
2. Representación esquemática de las proteínas truncadas JAZ1, JAZ2, JAZ3, JAZ6, JAZ12 y MYC2.	194
3. Prevención de la degradación de JAZ3 por JAZ3 Δ Jas mediada por el proteasoma	195
8.2. Tablas suplementarias	
1. Genes diferencialmente expresados en plantas <i>jai3-1</i> vs Col-0. También se incluyen los valores de plantas 35S::MYC2.	196
2. Genes diferencialmente expresados en ARNi <i>NINJA</i> vs Col-0.	197
3. Genes diferencialmente expresados en ARNi <i>NINJA</i> vs Col-0 tratados con COR 0,5 μ M.	199
 9. Artículos relacionados con la tesis	 205

Summary

The plant hormones jasmonates (JAs) are fatty acid derived oxylipins that have an essential role in plant adaptation to different types of stress, abiotic and biotic, and also are involved in the regulation of many physiological and developmental aspects. Despite the importance of JAs as signaling molecules in the transcriptional regulation, knowledge of the molecular mechanisms that it modulates was limited at the start of this job. In the search for new components of the JA signaling pathway, the Roberto Solano's lab isolated by a genetic screening a new mutant insensitive to JA, *jai3-1* (jasmonate-insensitive3-1). This gene encodes JAZ3, the founding member of the JAZ family. In this thesis, we proposed to define the function of the JAZ3 protein and the other members of the JAZ family in JA signaling, and the search for new molecular components that allowed us to advance on the knowledge of the regulation of the plant responses to stimuli associated with JAs.

The results of this study have demonstrated the existence of a family of repressors (JAZ) that link the perception of the hormone with the transcription factors (TF) that activate the responses to JA. Furthermore, identification of NINJA as an adapter protein which recruits the TPL and "TPL-related" proteins to form, together with the JAZ protein, the TF MYC's repressor complex had provided a molecular explanation of the repression mechanism in the JA signaling pathway. These results have also revealed how multiple hormonal signaling pathways can use similar mechanisms to suppress gene expression, because co-repressors TPL / TPR can be recruited by different hormonal pathways using different combinations of adapter and repressor proteins. Finally, in this thesis is described an additional repression model of the JA signalling, where some members of the JAZ family like JAZ5 and JAZ6, are able to interact directly with the co-repressor TPL through its EAR motif, without the adapter protein NINJA.

Understanding the mechanisms used by plants to respond dynamically to changes in the environment and adapt to the environment is a major challenge. The JAZs, NINJA and TOPLESS are a fundamental part of these mechanisms and play a crucial role in the integration of environmental cues with the basal development programs.

Resumen

El ácido jasmónico (JA) y sus derivados los jasmonatos (JAs) son fitohormonas lipídicas que conforman una familia perteneciente al grupo de las oxilipinas. Tienen un papel esencial en la adaptación de las plantas a distintos tipos de estrés, tanto abiótico como biótico y también participan en la modulación de numerosos aspectos fisiológicos y de desarrollo. A pesar de la importancia de los JAs como moléculas señalizadoras en la regulación de la transcripción génica, el conocimiento de los mecanismos moleculares de su vía de señalización era muy limitado al inicio de este trabajo. En la búsqueda de nuevos componentes de la ruta de la señalización de los JAs, el laboratorio de Roberto Solano aisló mediante cribado genético un nuevo mutante insensible a jasmónico, *jai3-1* (*jasmonate-insensitive3-1*). Este gen codifica JAZ3, miembro fundacional de la familia JAZ (*Jasmonate ZIM-domain protein*). En esta tesis, nos propusimos definir la función de la proteína JAZ3 y otros miembros de esta familia en la señalización de JAs, así como la búsqueda de nuevos componentes moleculares que nos permitieran avanzar en el conocimiento, desde un punto de vista molecular, de la regulación de las respuestas de la planta ante estímulos relacionados con los JAs. Los resultados de este trabajo han permitido demostrar la existencia de una familia de represores (JAZ) que enlazan la percepción de la hormona con los factores de transcripción (FT) que activan las respuestas a JA. Además, la identificación de NINJA como una proteína adaptadora que recluta a las proteínas TPL y *TPL-related* para formar, junto con las proteínas JAZ, el complejo represor de los FTs MYC, ha permitido obtener una explicación molecular del mecanismo de represión de la respuesta transcripcional dependiente de JA. Estos resultados también han puesto de manifiesto cómo múltiples vías de señalización hormonal pueden utilizar mecanismos similares para reprimir la expresión génica, ya que los co-represores TPL/TPR pueden ser reclutados a distintas vías mediante distintas combinaciones de proteínas adaptadoras y represoras. Finalmente, en este trabajo se describe un modelo adicional de represión de la vía de JA, donde algunos miembros de la familia JAZ, como JAZ5 y JAZ6, son capaces de interactuar de forma directa con el co-represor TPL a través de su motivo EAR, sin necesidad de la proteína adaptadora NINJA.

La comprensión de los mecanismos mediante los cuales las plantas responden dinámicamente a los cambios en el medio ambiente y se adaptan al entorno es un reto importante. Las proteínas JAZ, junto con NINJA y TOPLESS son parte fundamental de

dichos mecanismos y desempeñan un papel crucial en la integración de señales ambientales con los programas basales de desarrollo.

1. Introducción

1.1. El ácido jasmónico y los jasmonatos

El ácido jasmónico (JA) y sus derivados los jasmonatos (JAs) son fitohormonas lipídicas que se descubrieron en 1962 cuando se aisló el compuesto volátil Metil jasmónico (MeJA) como el componente principal de la esencia del jazmín (Demole y col., 1962). Posteriormente se descubrió que eran moléculas señalizadoras capaces de inducir la transcripción de inhibidores de proteinasas frente a insectos o de genes de defensa frente a patógenos (Farmer y Ryan, 1990).

El JA y sus derivados conforman una familia perteneciente al grupo de las oxilipinas que presenta homología estructural con las prostaglandinas animales, implicadas en procesos inflamatorios y en respuestas de defensa frente a infecciones, alergias y compuestos xenobióticos (Hamberg y Gardner, 1992; Calder y col., 2006; Durand y col., 2009; Wang y DuBois, 2010).

Los JAs tienen un papel esencial en la adaptación de las plantas a distintos tipos de estrés, tanto abiótico como biótico, actuando como reguladores generales de respuesta frente a patógenos, insectos, herida, exposición a ozono, radiación ultravioleta y déficit hídrico, entre otros (Devoto y col., 2005; Browse y Howe, 2008; Kazan y Manners, 2008; Browse, 2009; Wasternack y House, 2013). También participan en la modulación de numerosos aspectos fisiológicos y de desarrollo como la producción y maduración de gametos, el progreso del ciclo celular, la activación de la producción de antocianinas, la formación de tricomas, el crecimiento de la raíz, el enrollamiento del zarcillo en la vida y la senescencia (Feys y col., 1994; Ellis y Turner., 2001; Li y col., 2004; Boughton y col., 2005; Pauwels y col., 2008; Zhang y Turner, 2008; Pauwels et al., 2009; Reinbothe y col., 2009; Yoshida y col., 2009; Qi y col., 2011; Depuydt y Hardtke, 2011).

1.1.1. Metabolismo del JA

1.1.1.1. Biosíntesis de JA

En *Arabidopsis*, los JAs son sintetizados en la ruta de los octadecanoides a partir del ácido α -linolénico (18:3) (α LA) y el ácido hexadecatrienoico (16:3) (Gfeller y col., 2010; Wasternack y Kombrink, 2010; Acosta y Farmer, 2010; Wasternack y Hause, 2013). La síntesis de JA comienza en las membranas de los plastos, donde las enzimas fosfolipasas DAD1 y DONGLE liberan α LA a partir de fosfolípidos de membrana

(Hyun y col., 2008; Farmer y Ryan, 1992; Mueller y col., 1993). En el cloroplasto, el α LA es oxidado por acción de las 13-lipooxigenasas (13-LOX) generando ácido 13-(S)-hidroperóxido octadecatrienoico, 13-(S)-HPOT (Vick y Zimmerman, 1983; Bell y Mullet, 1993; Melan y col., 1993; Bannenber y col., 2009). Seguidamente y también en el plasto, la enzima sintasa de óxido de aleno (AOS1) deshidrata el 13-(S)-HPOT para convertirlo en ácido 12,13-epoxioctadecatrienoico u óxido de aleno (AO). La enzima AOS1 es un citocromo de la familia P450, CYP74A (Laudert y col., 1996; Laudert y Weiler, 1998). AOS1 constituye un paso esencial en la síntesis de la hormona ya que las plantas mutantes *aos1* son incapaces de sintetizar JA y presentan esterilidad masculina (Park y col., 2002; von Malek y col., 2002). La última reacción enzimática que ocurre en el plasto la lleva a cabo la enzima ciclasa de óxido de aleno (AOC) que convierte el AO en (9S,13S)-*cis*-(+)-OPDA (ácido oxo-fitodienoico) mediante una reacción de ciclación (Ziegler y col., 2000). El OPDA, en forma libre o esterificada como galactolípido de membrana (Andersson y col., 2006; Kourtchenko y col., 2007) es transportado al peroxisoma por un mecanismo que depende del transportador ABC CTS1/PXA1/PED3 (*COMATOSE1/PEROXIMAL ABC TRANSPORTER 1/PEROXISOME DEFICIENT3*) (Zolman y col., 2001; Theodoulou y col., 2005; Footfitt y col., 2007). Puesto que las mutaciones en el gen *CTS1* no bloquean totalmente las respuestas a JA, deben existir otros mecanismos que contribuyan a la exportación de (9S,13S)-*cis*-(+)-OPDA del cloroplasto (Theodoulou y col., 2005).

En el peroxisoma, el (9S,13S)-*cis*-(+)-OPDA es oxidado a ácido 3-oxo-2(2'(Z)-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico (OPC:8) por la enzima OPDA reductasa 3 (OPR3) (Schaller y Weiller, 1997). El mutante *opr3* de *Arabidopsis* presenta esterilidad masculina ya que es incapaz de producir JA (Costa y col., 2000; Strassner y col., 2002). Posteriormente tiene lugar la β -oxidación que acorta la cadena lateral carbonatada de la molécula OPC:8 y se lleva a cabo en tres rondas (Miersch y Wasternack, 2000). En primer lugar las enzimas acil-CoA sintasas (ACS), como la OPCL1, esterifican acetyl-CoA a OPC:8 dando lugar a OPC:8-CoA (Koo y Howe, 2007). Seguidamente intervienen de forma secuencial las enzimas acil-CoA oxidasas (ACX), que dan lugar a OPC:6, las proteínas multifuncionales (MFP) y las enzimas del tipo 3-cetoacil-CoA tiolasa, como KAT2, dando lugar a JA-CoA (Miersch y Wasternack, 2000; Schillmiller y col., 2007; Delker y col., 2007; Castillo y León, 2008). La liberación del CoA da lugar al primer jasmonato, el (+)-7-iso-JA, que se libera del peroxisoma al citoplasma por un

mecanismo desconocido hasta el momento. Todos los genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de JA se inducen por JA lo que lleva a suponer que la regulación de la biosíntesis de JA se lleva a cabo por un mecanismo de retroalimentación positiva (Wasternack, 2006). (Figura 1).

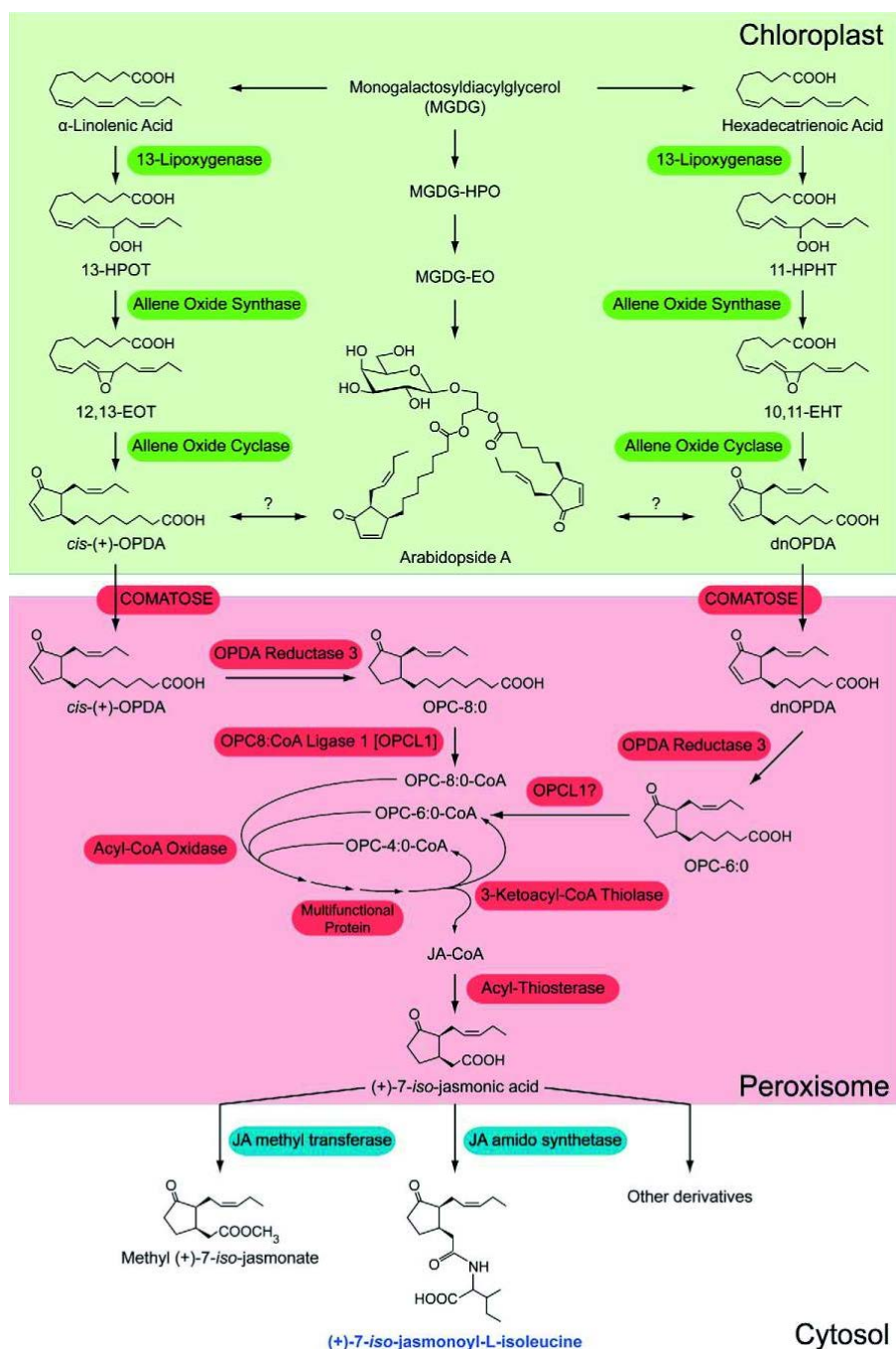


Figura 1. Biosíntesis del JA. La ruta de síntesis de JA se produce en dos compartimentos celulares, plastos y peroxisomas. Este proceso se inicia con la hidrólisis de ácidos grasos en el cloroplasto y tras distintas reacciones enzimáticas, termina con la liberación de JA al citoplasma de la célula (Adaptado de Acosta y Farmer, 2010).

El compuesto (+)-7-*iso*-JA es inestable y está en equilibrio con la forma trans [(-)-JA] y ambas formas son el punto de partida para la síntesis de los distintos metabolitos derivados del JA. La enzima JA metiltransferasa (JMT) metila en JA en su grupo carboxilo dando lugar a MeJA (Creelman y Mullet, 1995). En *Arabidopsis*, por acción de la enzima JAR1 se pueden formar JA-Isoleucina (JA-Ile), JA-Leucina (JA-Leu), JA-Valina (JA-Val), JA-Fenilalanina (JA-Phe), JA-Triptófano (JA-Trp) y JA-ACC, donde el compuesto ACC es la molécula precursora de la síntesis de etileno (ET) (Staswick y Tiryaki, 2004; Staswick, 2009). También se dan otras reacciones donde el JA puede ser esterificado con glucosa, o hidroxilado en las posiciones de la cadena carbonatada 11 o 12. Además, el 12-OH-JA puede ser sulfonado, glucosilado o conjugado con Ile (Gidda et al., 2003; Swątek et al., 2004) (figura 2).

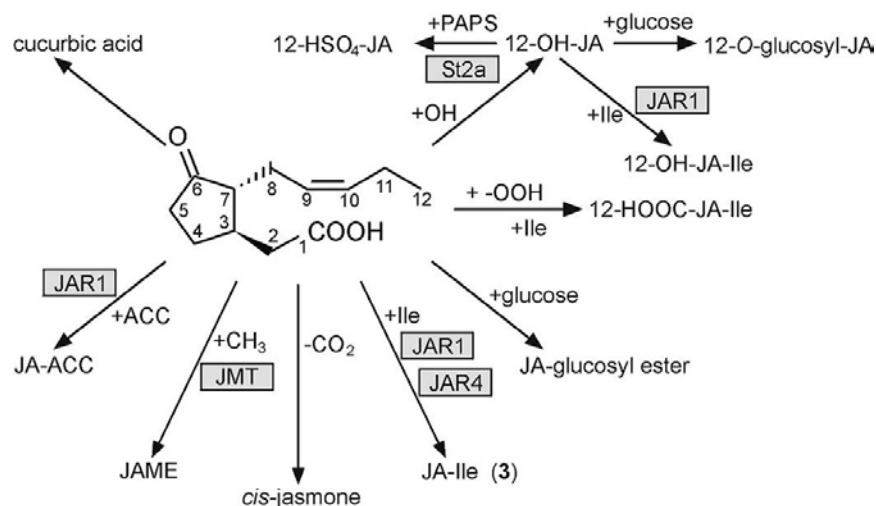


Figura 2. Derivados del JA. La molécula de JA en el citoplasma se modifica químicamente por adición y/o sustracción de grupos funcionales dando lugar a distintos derivados. Se han identificado las enzimas JAR1 y JAR4 y la enzima metiltransferasa de JA (JMT) responsables de la formación de JA-Ile y MeJA, respectivamente. Además el citocromo CYP94B3 es el responsable de la inactivación de JA-Ile por hidroxilación y carboxilación (Adaptado de Wasternack y Kombrink, 2009).

Aunque se ha considerado al JA y MeJA como las principales moléculas biológicamente activas (Creelman y Mullet, 1995), estudios recientes han demostrado que ambos son precursores del jasmonato bioactivo JA-Ile, entendiendo molécula bioactiva como aquella capaz de unirse al receptor y activar una respuesta fisiológica (Staswick y Tiryaki, 2004; Suza y col., 2010; Fonseca y col., 2009a).

En la naturaleza el compuesto JA-Ile existe como una mezcla racémica de los diastereoisómeros (-)-JA-L-Ile y (+)-7-*iso*-JA-L-Ile (Miersch y col., 1986; Guranowski y col., 2007; Fonseca y col., 2009a), pero ensayos bioquímicos con cada uno de los isómeros puros de JA-Ile demostraron que la forma bioactiva de la hormona es el compuesto (+)-7-*iso*-JA-L-Ile (Fonseca y col., 2009a).

1.1.1.2. Catabolismo de JA

Se han descrito distintos tipos de mecanismos de inactivación metabólica de la hormona bioactiva, el JA-Ile, que lleva a la atenuación de la señalización que controla dicha hormona. En primer lugar mediante epimerización se desplaza el equilibrio de la forma bio-activa de la hormona (+)-7-*iso*-JA-L-Ile a su forma inactiva (-)-JA-L-Ile, y se ha sugerido que esta epimerización podría estar regulada por cambios en el pH o en el estado redox de la célula (Fonseca y col., 2009a; 2009b). También el propio JA puede ser inactivado por epimerización de la forma *cis* [(+)-7-*iso*-JA] a la *trans* [(-)-JA] (Farmer, 1994; Schulze y col., 2006). Además, la inactivación también puede ser llevada a cabo por amidohidrolasas, como la IAR3 (*IAA-ALANINE RESISTANT 3*) o la ILL6 (*IAA-LEUCINE RESISTANT (ILR)-LIKE GENE 6*), que catalizan el paso de JA-Ile a JA (Woldemariam y col., 2012; Widemann y col., 2013). Finalmente, la inactivación puede llevarse a cabo mediante oxidación del carbono 12 de la cadena carbonatada del JA-Ile que dará lugar a 12-OH-JA-Ile y al compuesto más polar 12-COOH-JA-Ile (Miersch y col., 2008; Glauser y col., 2008). Esta oxidación es llevada a cabo por los citocromos P450 CYP94B3 y CYP94C1 (Koo y col., 2011; Kitaoka y col. 2011; Heitz y col., 2012; Koo y col., 2014).

1.2. Funciones de los JAs

1.2.1. Defensa

En la naturaleza, las plantas son atacadas de forma simultánea por patógenos biotrófos, necrotrófos o por insectos. Ante un factor de estrés determinado la planta activa una respuesta concreta, tanto a nivel local como sistémico, que resulta del balance de las diferentes vías de señalización que participan y que dará lugar a la activación transcripcional, síntesis y degradación de proteínas o la acumulación de metabolitos secundarios (Fujita y col., 2006; Balbi y Devoto, 2008; Acosta y Farmer, 2010; Wasternack y Hause, 2013). Los JAs tienen un papel principal en la activación de defensas frente a patógenos necrotrófos y frente a insectos masticadores.

1.2.1.1. Patógenos necrotrofos

Los JAs son importantes mediadores en la defensa frente a patógenos necrotrofos ya que los mutantes de síntesis o señalización del JA presentan mayor susceptibilidad a dichos patógenos (Vijayan y col., 1998; Penninckx y col., 1998 Tiryaki y Staswick, 2002; Lorenzo y col., 2003; Lorenzo y col., 2004; Kachroo y Kachroo, 2009). La activación de estas defensas requiere una acción conjunta (sinérgica) del JA con el ET (Lorenzo y col. 2003; Jones y Dangl, 2006; Erb y col., 2012; Thaler y col., 2012; Pieterse y col., 2012). La integración de estas dos señales esta mediada por FTs de la familia ERF/AP2, como ERF1 y ORA59 (Pré y col. 2008), cuya expresión se induce por la acción simultanea de ambas hormonas y activan la expresión de genes *PR* (*Patogenesis Related*) como *PDF1.2* y *b-CHI* (Berrocal-Lobo y col., 2002; Lorenzo y col., 2003; McGrath y col., 2005; Pré y col., 2008; van Verk et al., 2011). ERF1 está regulado transcripcionalmente por EIN3 (Solano y col., 1998) y se ha descrito que la actividad de EIN3 está regulada por su interacción directa con la familia de represores JAZ (*Jasmonate ZIM-domain protein*), que se degradan en respuesta a JA-Ile (Zhu y col., 2011). Además de ERF1 y ORA59, otros FT ERF/AP2, activadores, como ERF2, y represores como ERF4, participan en esta interrelación JA/ET (McGrath y col., 2005; Pré y col., 2008; Zarei y col., 2011; Kazan, 2015).

Además, en la resistencia a la infección fúngica también se ha descrito un papel de los FTs ANAC019 y ANAC055. Ambos actúan por debajo de MYC2 en la cascada de señalización y son activadores de genes de respuesta a JA como *LOX2* y *VSP1* (Delessert y col., 2005; Bu y col., 2008).

También se ha descrito que las plantas producen N-acilamidas que confieren resistencia a patógenos necrotrofos mediante la activación de la cascada de señalización del JA y su biosíntesis (Méndez-Bravo y col., 2011).

Además de los patógenos necrotrofos, las plantas pueden ser también infectadas por patógenos biotrofos. La defensa frente a estos patógenos se regula por la vía del ácido salicílico (SA) principalmente (Durrant y Dong, 2004; Loake y Grant 2007). El JA modula negativamente la respuesta a patógenos biotrofos mediante antagonismo con el SA y viceversa (Bari y Jones, 2009). Así, *NPR1*, un componente principal de la ruta del SA, media la supresión de las defensas reguladas por JA (Bruessow y col., 2010; León-

Reyes y col., 2010; Thaler y col., 2012). Por el contrario, los mutantes defectivos en la señalización de JA como *coil* o *jin1* son más resistentes a la infección por bacterias hemibiotrofas como *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*) (Feys y col., 1994; Kloeck y col., 2001; Laurie-Berry y col., 2006). Algunas cepas de esta especie de bacterias, como *P. syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), mejoran su capacidad infectiva sintetizando coronatina (COR). La COR es una toxina que funciona como mimético funcional de la hormona activa JA-Ile, debido a su alto grado de similitud estructural, y favorece la formación del complejo co-receptor COI-JAZ activando, por tanto, la señalización por JA (Thines y col., 2007; Katsir y col., 2008; Melotto y col., 2008; Yan y col., 2009; Fonseca y col., 2009a). Debido al antagonismo entre las rutas de señalización de JA y SA, la activación de la ruta del JA por la COR en la planta infectada provoca la inactivación de las defensas mediadas por SA, lo que favorece la proliferación de la infección (Zhao y col., 2003; Brooks y col., 2005).

1.2.1.2. Herbívoros

La ruta de señalización de JA juega un papel esencial en la activación de las defensas de la planta frente a los herbívoros y el daño ocasionado por herida. El JA participa en la inducción génica de genes de defensa y de biosíntesis de *novo* de la hormona, en la producción de metabolitos secundarios que actúan como insecticidas o repelentes y en la formación de tricomas que son barreras naturales para repeler el ataque de los herbívoros (Reymond y col., 2004; Howe y Jander, 2008; Yan et al., 2007; Zhang y Turner, 2008; Yoshida et al., 2009; Schweizer y col., 2013).

Entre los genes de defensa inducidos por JA se encuentran los involucrados en la síntesis de *novo* de la hormona (*LOX2*, *AOS*, *OPR3* o *JAR1*) (Rayapuram y Baldwin, 2006; Chung y col., 2008; Steppuhn y col., 2008; Wang y col., 2008; Meldau y col., 2011). También se inducen genes implicados en la señalización del JA, como los genes de la familia *JAZ* o el factor de transcripción (FT) *MYC2* y genes de defensa como las lectinas, defensinas y mirosinasas implicadas en la producción de metabolitos secundarios como los glucosinolatos (Yan et al., 2007; Zhang y Turner, 2008; Yoshida et al., 2009; Schweizer y col., 2013).

Además, el JA controla cambios en el desarrollo de las hojas que han sido heridas, por ejemplo aumenta la formación de tricomas (Yan et al., 2007; Zhang y Turner, 2008;

Yoshida et al., 2009) mediante la activación transcripcional de los complejos formados por los FT MYB, TT8, GL3 y EGL3 (Payne y col., 2000; Zhang y col., 2003; Zhao y col., 2008; Yoshida y col., 2009; Qi y col., 2011).

1.2.2. Desarrollo

Los JAs además de regular respuestas de defensa también participan en procesos de desarrollo (Browse, 2009). Entre ellos, el mejor caracterizado es el control de la fertilidad. En *Arabidopsis*, los mutantes deficientes en la síntesis de JA (*fad 3-2 fad7-2 fad8*, *dad1*, *aos1*, *opr3/dde1*) y algunos mutantes de señalización como *coi1* presentan esterilidad masculina, ya que regulan la maduración de los granos de polen, la elongación del filamento del estambre y la dehiscencia de la antera (Feys y col., 1994; McConn y Browse, 1996; Sanders y col., 2000; Stintzi y Browse, 2000; Ishiguro y col., 2001; Stintzi y col., 2001; Park y col., 2002; von Malek y col., 2002). Además, el JA induce la expresión de numerosos genes en el tejido del estambre, entre ellos varios FT de la familia MYB, como MYB21, MYB24 y MYB108 que juegan un papel esencial en la fertilidad de la planta (Mandaokar y col., 2003; Mandaokar y col., 2006; Cheng y col., 2009; Mandaokar y Browse, 2009). Además de estos FTs, se ha descrito que el FT MYC5 está implicado en la regulación de la fertilidad masculina, y podrían actuar en este proceso de forma redundante con otros MYCs (Figueroa y Browse, 2015).

Por otra parte, las plantas mutantes para el gen *COI* de tomate, que tienen graves defectos en la viabilidad y germinación del polen, además presentan esterilidad femenina (Li y col., 2004b).

1.3. Señalización de JA

1.3.1. SCF^{COI1}

El primero de los elementos descubierto en la ruta de señalización de JA fue la proteína COI1, identificado genéticamente como un mutante insensible a COR (Feys y col., 1992). El gen responsable de la mutación *coi1* se identificó en *Arabidopsis* mediante clonación posicional y se vio que codificaba una proteína con un dominio *F-box* (Xie y col., 1998).

En *Arabidopsis*, *COI1* tiene una función esencial en la regulación de la señalización por JA. Los mutantes *coi1* presentan insensibilidad a la JA en el crecimiento de la raíz, son

estériles, y carecen de expresión de proteínas inducidas por JAs, como AtVSP, y proteínas implicadas en la defensa de la planta, como PDFs y Thi2.1 (Xie y col., 1998; Devoto y col., 2002; Xu y col., 2002; Devoto y col., 2005). Además, estudios transcriptómicos en mutantes *coi1* muestran que COI1 regula la expresión de un gran número de genes de respuesta a JAs (Wang y col. 2008; Devoto y col. 2005). Los ortólogos de *COI1* en tomate tienen un papel similar (Li y col. 2004). Todo esto indica que *COI1* es necesario para todas las respuestas dependientes de JA probadas hasta el momento y su función esta conservada en distintas plantas.

COI1 codifica una proteína que en su estructura presenta repeticiones ricas en leucina y un dominio *F-box* (Xie y col., 1998; Devoto y col., 2002; Xu y col., 2002). Las proteínas *F-box* forman parte de complejos SCF (Skip/Cullin/Fbox) ubiquitin ligasa E3, cuya función es la ubiquitinación de proteínas que serán degradadas en el proteasoma (Linghui y col. 2002; Feng y col. 2003; Lechner y col., 2006). Se ha demostrado que COI1 se asocia a componentes de complejos SCF, como ASK1, ASK2, CUL1 o RBX (Xu y col., 2002; Feng y col., 2003; Takahashi y col., 2004). Mutaciones de pérdida de función en estas proteínas o en otras que actúan como reguladores del complejo SCF, como AXR1, JAI4/SGT1b o CSN muestran deficiencias en la señalización de JA, tanto en inducción de la expresión génica, como en la defensa frente a patógenos o la inhibición del crecimiento de la raíz dependientes de JA (Kitagama y col. 1999; Austin y col. 2002; Azevedo y col., 2002; Tiriyaki y Staswick, 2002; Xu y col., 2002; Feng y col., 2003; Gray y col. 2003; Lorenzo y col., 2004; Lorenzo y Solano, 2005; Ren y col., 2005; Kawamura y col., 2009; Hind y col., 2011; Uppalapati y col., 2011).

Todos estos datos apuntan a que COI1 forma parte de complejos SCF, y que por tanto, la degradación de proteínas por el proteosoma es un mecanismo fundamental de regulación de la señalización de JA (Chini y col. 2007).

El complejo SCF está formado por 4 subunidades: ASK1, CDC53 (o culina), RBX1 (*ring box protein*) y *F-box*. La culina se une a RBX1 y a ASK, y esta última interacciona con la *F-box* (Linghui y col. 2002; Devoto y col. 2002; Moon y col. 2004). Las *F-box* son una superfamilia de proteínas llamadas así por un dominio altamente conservado de 60 aminoácidos en la región amino terminal responsable de la unión a

ASK1. Existen también dominios de interacción proteína-proteína, como las regiones ricas en leucinas, donde se unirán los sustratos (Gagne y col., 2004; Moon y col., 2004). Estos complejos participan en la regulación de distintas vías de señalización hormonal (auxinas (AUX), giberelinas (GA), JAs, ET, etc.), fotomorfogénesis, ritmos circadianos, desarrollo floral y senescencia (Leyser y col., 1993; Penninckx y col., 1996; Pozo y col., 1998; Lorenzo y Solano, 2005; Shen y col. 2012; Salehin y col., 2015). La especificidad de cada ruta viene dada por la subunidad *F-box*, ya que el resto de las subunidades son comunes a todos los complejos SCF.

La resolución cristalográfica de la estructura de COI1 ha revelado que esta proteína es el co-receptor de JA-Ile, la hormona bioactiva (Fonseca y col., 2009a; Sheard y col., 2010). COI1 es estructuralmente semejante a TIR1, otra proteína *F-box* que participa en los complejos SCF^{TIR1} y está implicada en la percepción de auxinas y degradación de los represores AUX/IAA (Dharmasiri y col., 2005; Kepinski y Leyser, 2005; Tan y col., 2007). En la zona N-terminal, COI1 tiene el dominio conservado *F-box*, que consta de tres hélices, y es el responsable de la unión a ASK1. En la parte C-terminal contiene 18 repeticiones en tándem ricas en leucina (LRRs) que forman una estructura tridimensional en forma de herradura que conforman el dominio donde se da la unión a JA-Ile (Melotto y col., 2008; Sheard y col., 2010).

Los datos genéticos, bioquímicos y cristalográficos han puesto de manifiesto la importancia de COI1 en la señalización de JA tanto en su faceta de co-receptor de la hormona, como en su función de *F-box* implicada en la ubiquitinación y degradación de los represores de esta ruta hormonal, las proteínas JAZ (Chini y col., 2007; Thines y col., 2007; Yan y col., 2007) que serán objeto de estudio en esta tesis.

1.3.1.1. Vía ubiquitin-proteasoma 26S

En plantas, la regulación de la degradación de proteínas por la vía ubiquitin-proteasoma 26S afecta a numerosos procesos, entre ellos la regulación de la señalización hormonal (Moon y col., 2004; Stone y col., 2005; Chini y col., 2007; Yee y Goring, 2009; Trujillo y Shirasu, 2010; Wang y Deng, 2011; Irigoyen y col., 2014; Stone, 2014; del Pozo y Manzano, 2014).

La función principal de esta vía es conjugar ubiquitina a residuos de lisina de las proteínas diana, esto las marca como sustratos del proteasoma 26S, donde serán degradadas. En el proceso de ubiquitinación intervienen tres enzimas. La E1 (enzima activadora de la ubiquitina) genera la forma activa de la ubiquitina formando un enlace tioéster en el carboxilo terminal, y la transfiere a la enzima E2. Esta reacción depende de ATP. E2 se une a E3 y transfiere la ubiquitina a la proteína diana, que está unida a E3. E3 es la enzima que da especificidad de sustrato (y dentro de la E3, la *F-box*). Este proceso de ubiquitinación se repite varias veces ya que el proteasoma 26S degrada proteínas poliubiquitinadas (del Pozo y Stelle, 2000; Mazzucotelli y col., 2006; Marino y col., 2012; Chen y Hellmann, 2013; Duplen y Rivas, 2014).

El proteasoma 26S es un complejo formado por una subunidad proteolítica 20S y partículas reguladoras 19S. La subunidad proteolítica la forman subunidades α y β dispuestas formando un canal que es donde la proteína se degrada en pequeños péptidos. Las subunidades reguladoras se disponen a ambos lados del canal. Las de la región de entrada reconocen los sustratos poliubiquitinados y reciclan la ubiquitina, y las de la base impiden que el sustrato se despliegue mientras está siendo procesado (Moon y col., 2004; Vierstra, 2009).

1.3.2. Factores de transcripción

Los FTs que regulan respuestas a JA son mayoritariamente de tipo bHLH. En *Arabidopsis*, se han identificado alrededor de 133 genes bHLH. Estos genes se subdividen en 12 familias, y en cada uno de los grupos principales hay motivos conservados fuera del motivo de unión a ADN (dominio bHLH). La posible redundancia entre los miembros de los subgrupos podría deberse a que algunos de ellos comparten la misma función (Heim y col., 2003).

Dentro de la familia de los bHLH, e implicados en la vía de señalización de JA, se han descrito los FTs MYC2, MYC3, MYC4, MYC5, bHLH003, bHLH013 y bHLH017. Todos ellos son dianas directas de las proteínas represoras JAZs, identificadas y caracterizadas en este trabajo (Lorenzo y col., 2004; Fernández-Calvo y col., 2011; Cheng y col., 2011; Niu y col., 2011; Sasaki-Sekimoto y col., 2013; Song y col., 2013; Nakata y col., 2013; Fonseca y col., 2014; Figueroa y Browse, 2015).

1.3.2.1. MYC2

Es el FT mejor caracterizado hasta la fecha implicado en la vía de señalización del JA, además de ser la primera diana descrita de las proteínas represoras JAZs (Chini y col. 2007; Kazan y Manners, 2013).

En *Arabidopsis*, MYC2 está codificado por el gen *JIN1/JAI1* (*JASMONATE INSENSITIVE 1*), que fue identificado en un escrutinio genético de mutantes insensibles a la hormona (Berger y Col., 1996; Lorenzo y col., 2004). De forma paralela en tomate, y mediante un escrutinio con librerías de ADNc se llegó al descubrimiento de MYC2 y MYC10 (Boter y col., 2004). En ambas especies los ortólogos funcionales del gen MYC2 se inducen por JA y por daño mecánico. Esta inducción depende de *COI1*.

En *Arabidopsis*, el mutante de pérdida de función *jin1* (Lorenzo y col., 2004) muestra una pérdida de respuesta a JA. Sin embargo, el fenotipo de estos mutantes es más débil que el de *coil*, lo que sugiere que no todos los procesos regulados por COI1 están alterados en *jin1*. Por ejemplo, la fertilidad masculina, que es un carácter regulado por JA y defectivo en *coil*, no está afectada en los alelos de *jin1*. Además, *jin1* se caracteriza por ser parcialmente insensible a JA en la inhibición del crecimiento de la raíz provocada por JA y es más resistente a patógenos necrotrofos como *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) y *Plectosphaerella cucumerina* (Lorenzo y col., 2004).

Análisis de expresión génica realizados con varios alelos mutantes de MYC2, confirman que MYC2 regula la expresión de un amplio conjunto de genes relacionados con la señalización de JA (Lorenzo et al., 2004; Dombrecht y col., 2007). La expresión constitutiva de MYC2 en plantas transgénicas da como resultado una hipersensibilidad a la hormona, pero no promueve una respuesta constitutiva a JA en ausencia de la señal hormonal. Todo esto sugiere la existencia de factores adicionales que cooperan con MYC2 en la activación de la respuesta a esta fitohormona (Lorenzo y col., 2005, Fernández-Calvo y col., 2011, Schweizer y col., 2013; Fonseca y col., 2014; Kazan y Manners, 2013).

A nivel molecular, MYC2 regula diferencialmente dos grupos de genes inducidos por JA (Lorenzo y col., 2004; Dombrecht y col., 2007). El primer grupo incluye genes implicados en la respuesta de defensa frente a bacterias, patógenos necrotrofos y en el

metabolismo del triptófano, y se encuentran reprimidos por MYC2. El segundo grupo de genes lo forman genes relacionados con la respuesta sistémica a herida, biosíntesis de antocianinas y flavonoides, inhibición del crecimiento de la raíz y biosíntesis de JA, y es activado por MYC2. Además, MYC2 altera la expresión de diversos FTs, de genes que participan en la modulación de niveles de metabolitos como tocoferoles, de genes que controlan el balance de fitohormonas (induce a *AOC4* implicada en la síntesis de JA, y reprime a *ACS6* implicada en la síntesis de ET) y el equilibrio de óxido-reducción, modifica la expresión de genes relacionados con la síntesis y transporte de auxinas, regula positivamente la síntesis de glucosinolatos, que son metabolitos secundarios que participan en la defensa frente a patógenos (Boter y col., 2004; Lorenzo y col., 2004; Lorenzo y Solano, 2005; Kazan y Manners 2014; Schweizer y col., 2013).

La proteína MYC2 se localiza en el núcleo celular, sin que esta ubicación parezca estar regulada hormonalmente (Lorenzo y col., 2004, Chini y col. 2007). Mediante el uso de *Protein-Binding-Microarrays* (PBMs; Godoy y col., 2011) se ha demostrado que MYC2 reconoce la caja G (CATGTG) y variantes, como la caja T/G (AACGTG) (Godoy y col., 2011; Franco-Zorrilla y col., 2014). Estas cajas son elementos *cis* indispensables en la expresión mediada por JA de VSP1 y PDF1.2 en *Arabidopsis* (Guerineau y col., 2003; Brown y col., 2003). También se encuentran en promotores de genes regulados por JA y que participan en la defensa frente a patógenos, respuesta frente a insectos y a herida, estrés hídrico, fotosíntesis, producción de alcaloides, etc. (Abe y col., 2003; Guerineau y col., 2003; Boter y col., 2004; Yadav y col., 2005; Chini y col., 2007; Dombrech y col., 2007; Bilgin y col., 2010; Godoy y col., 2011). En tabaco y patata se ha visto que la caja G se requiere para la transcripción de genes inducidos por JA o MeJA, lo que sugiere que su función está conservada filogenéticamente (Kim y col., 1992; Delessert y col., 2004; Xu y col., 2004; De Boer y col., 2011; Shoji y Hashimoto, 2011).

Para iniciar la transcripción MYC2 interacciona con la proteína MED25, que forma parte del complejo regulador que recluta a la ARN polimerasa II requerida para iniciar la transcripción (Kidd y col., 2009; Cevik y col., 2012; Chen y col., 2012).

De forma adicional, MYC2 es un FT que influye en las rutas de señalización de respuesta a la luz, ET y ABA en *Arabidopsis*. Todo esto sugiere que podría actuar como

un integrador general de la respuesta de la planta a diferentes tipos de estrés ambiental (Abe y col., 2003; Yadav y col., 2005; Dombrecht y col., 2007; Gangappa y col., 2010; Kazan y Manners, 2013; Zhu y col., 2014; Chico y col., 2014).

Por otra parte, *MYC2* es necesario en la supresión de las defensas que dependen de SA durante la infección con *P. syringae* (Laurie-Berry y col., 2006). Además, participa en el establecimiento de la resistencia sistémica inducida (ISR) cuando las raíces de *Arabidopsis* son colonizadas por la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* (Pozo y col., 2008).

Recientemente se ha descrito que *MYC2* participa en la regulación de la respuesta de defensa dependiente de JA en condiciones de sombra, donde su desestabilización en dichas condiciones provoca un aumento de la susceptibilidad frente a patógenos. La estabilidad de *MYC2* está regulada por el ratio R/FR, participando en dicha regulación los fitocromos A y B (Moreno y col., 2003; Chico y col., 2014).

Estructuralmente la proteína *MYC2* presenta un dominio HLH formado por dos hélices alifáticas unidas por una región aminoacídica implicada en la formación de homo y hetero-dímeros con otros FTs, como *MYC3* y *MYC4*, que se describirán a continuación (Fonseca y col. 2009; Fernández-Calvo y col., 2011). También posee una región básica de unión a ADN (Toledo-Ortiz y col. 2003) y una región denominada JID (*JAZ-Interaction-Domain*) por la que interacciona con las proteínas JAZ, presente también en los FT *MYC3* y *MYC4* (Chini y col., 2007; Fernández-Calvo y col., 2011). Además *MYC2* posee una región rica en residuos de serina caracterizada como dominio de fosforilación, y se ha descrito que la fosforilación tiene un papel importante en la regulación de la señalización por JA (Rojo y col., 1998; Takahashi y col., 2007; Hiruma y col., 2011). Las kinasas moduladoras podrían ser MKK3-MAPK6, ya que ambas tienen un papel en la inhibición del crecimiento de la raíz y la expresión de genes dependientes de JA. El JA activaría a MAPK6 de modo dependiente de MKK3 y ambas reprimirían la acción transcripcional de *MYC2* (Takahashi y col., 2007; Schweighofer y Meskiene, 2008; Hettenhausen y col., 2014). Sin embargo, recientemente se ha identificado que la fosforilación del aminoácido Thr328 es fundamental para la activación de *MYC2* y subsecuente degradación (Qingzhe y col., 2013).

1.3.2.2. MYC3, MYC4 y MYC5

Distintos grupos de investigación han identificado y caracterizado otros tres miembros de la familia bHLH, MYC3, MYC4 y MYC5, cercanos filogenéticamente a MYC2 (Fernández-Calvo y col., 2011; Cheng y col., 2011; Niu y col., 2011; Figueroa y Browse, 2015).

Son proteínas nucleares que unen ADN con especificidad de unión similar a MYC2 (Godoy y col., 2011; Fernandez-Calvo y col., 2011; Franco-Zorrilla y col., 2014). Además, interaccionan con los represores JAZ, caracterizados en esta tesis, por el dominio JID y pueden formar homo- y heterodímeros entre ellos y con MYC2 por el dominio HLH (Fernández-Calvo y col., 2011; Figueroa y Browse, 2015).

MYC3 y MYC4 actúan sinérgicamente con MYC2 activando respuestas a JA, como la inhibición del crecimiento de la raíz y la defensa frente a patógenos e insectos. Mutaciones de pérdida de función en MYC3 y MYC4 comprometen la respuesta a JA e incrementan la insensibilidad a la hormona de los mutantes *jin1*. Además, los triples mutantes *myc2 myc3 myc4* son tan defectivos como *coi1-1* en la activación de algunas de las respuestas dependientes de JA, como por ejemplo, la susceptibilidad al patógeno bacteriano *P. syringae*, la resistencia al herbívoro generalista *Spodoptera littoralis* o la inducción de genes de respuesta a JA (*JAZ10* y *VSP2*) (Fernández-Calvo y col., 2011; Cheng y col., 2011; Niu y col., 2011).

MYC3 y MYC4 comparten funciones con MYC2, pero cada uno de ellos parece tener un papel predominante en un proceso concreto. Mientras que MYC2 juega un papel principal en la inhibición del crecimiento de raíz, MYC3 y MYC4 parecen ser más importantes en la regulación de las respuestas frente a herbívoros (Fernández-Calvo y col., 2011).

Además, estos FTs son esenciales para la inducción transcripcional de los enzimas implicados en la biosíntesis de glucosinolatos, que son metabolitos secundarios implicados en la defensa frente a insectos (Schweizer y col. 2013).

También se ha descrito que estas proteínas se desestabilizan en condiciones de sombra (luz enriquecida en luz infrarroja). La inactivación de la vía de señalización del JA,

mediada por la desestabilización de los FT que la activan, da lugar a una mayor susceptibilidad a patógenos en dichas condiciones (Chico y col., 2015).

Mientras MYC2, MYC3 y MYC4 parecen estar más implicados en respuestas a JA en tejido vegetativo, MYC5 parece estar implicado en la regulación de la fertilidad masculina, ya que regula la viabilidad del polen, la dehiscencia de las anteras y la elongación del filamento del estambre, induciendo la expresión de MYB21 (Figuerola y Browse, 2015).

1.3.2.3. bHLH003, bHLH013 y bHLH017

Recientemente se han identificado otros FTs de tipo bHLH (bHLH003, bHLH013 y bHLH017), filogenéticamente relacionados con MYC2, MYC3, MYC4 y MYC5 (Sasaki-Sekimoto y col., 2013; Song y col., 2013; Nakata y col., 2013; Fonseca y col., 2014).

Estos tres FTs, a diferencia de lo descrito para los MYCs, se comportan como represores transcripcionales de respuestas dependientes de JA, como son la inhibición del crecimiento de la raíz, acumulación de antocianinas y clorofilas y resistencia frente a patógenos bacterianos (Sasaki-Sekimoto y col., 2013; Song y col., 2013; Nakata y col., 2013; Fonseca y col., 2014). Estos FTs tienen la misma especificidad de unión a ADN que los MYCs (Fonseca y col., 2014), lo que ha sugerido que podrían reprimir la vía del JA mediante competición con los FT MYCs por las secuencias diana *cis* de los promotores que regulan.

1.3.2.4. Otros factores *cis* y *trans*

Las proteínas JAZs interaccionan con los FTs EIN3 y EIL1, inhibiendo su actividad transcripcional en respuesta a ET. Esta regulación es clave para entender el sinergismo entre la hormona ET y JA en la activación de defensas (Zhu y col., 2011). El ET estabiliza a las proteínas EIN3 y EIL1, mientras que una parte de las mismas se mantiene inactiva por la acción de los represores JAZs. La acción conjunta de ET y JA tiene un efecto sinérgico puesto que estabiliza y des-reprime a estos FTs (Zhu y col., 2011).

Se ha descrito que los FTs de tipo BHLH, GL3 (*GLABRA3*), EGL3 (*ENHANCER OF GLABRA3*) y TT8 (*TRANSPARENT TESTA8*), junto con los FTs MYB75 y GL1 (*GLABRA1*) participan en la regulación transcripcional dependiente de JA que activa la producción de antocianinas e iniciación de tricomas en *Arabidopsis*. Estos FT son también dianas de los represores JAZ (Qi y col., 2011).

Entre los genes implicados en la ruta de señalización de los JA, cuya expresión depende de COI1 se encuentran numerosos FTs de las familias ERF/AP2, WRKY, ORA, NAC, b-ZIP y ARF (Lorenzo y col., 2003; Heim y col., 2003; Lorenzo y col., 2004; Li y col., 2004; McGrath y col., 2005; Nagpal y col., 2005; Yang y col., 2005; Li y col., 2006; Chini y col., 2007; Pauwels y col. 2008; Pré y col. 2008; Tabata y col., 2010; Zander y col., 2010; Zarei y col., 2011; Fernández-Calvo y col., 2011; Fonseca y col., 2014). No se ha visto que estos FTs interaccionen con los represores JAZ, por lo que se suponen que deben ser dianas de los FTs descritos arriba.

Además de las cajas G y derivados, se han descrito otros elementos *cis* regulados por JA, como el motivo GCC, el elemento TGACG o las secuencias JASE (*JASMONATE-RESPONSIVE ELEMENT*) (Mummelink, 2009). El motivo GCC es un elemento de respuesta a JA y ET (Ohme-Takagi y Shinshi, 1995; Menke y col., 1999; Fujimoto y col., 2000; Brown y col., 2003). En *Arabidopsis* el motivo GCC aparece en genes como *PDF1.2* que se inducen en respuesta a patógenos necrotrofos donde JA y ET actúan de forma sinérgica (Penninckx y col., 1998). La expresión de este gen está regulada por ERF1 (Solano y col., 1998), que reconoce específicamente el motivo GCC, como se ha demostrado mediante el uso de *Protein-Binding-Microarrays* (PBMs) (Godoy y col., 2011, Franco-Zorrilla y col., 2014).

1.4. Antecedentes en el laboratorio

1.4.1. Identificación de *JAI3/JAZ3*

Al inicio de esta tesis, el complejo SCF^{COI1} y el FT MYC2 eran los dos componentes esenciales y mejor caracterizados de la ruta de señalización de JA. En la búsqueda de nuevos componentes de la ruta de señalización de JA en *A. thaliana*, en el laboratorio de Roberto Solano se aisló mediante cribado genético un nuevo mutante dominante insensible a JA, *Jasmonate-Insensitive3-1* (*jai3-1*; Lorenzo et al., 2004).

Análisis transcriptómicos demostraron que en mutantes *jai3-1* la expresión de genes implicados en la respuesta a JA estaba reprimida en comparación con plantas silvestres (Figura 3a y apéndice tabla suplementaria 1).

La mayoría de los 31 genes que se encuentran reprimidos en *jai3-1* se inducen en plantas silvestres por tratamiento con JA (Figura 3a). Estos resultados apoyan la hipótesis de que JAI3/JAZ3 es esencial en la vía de señalización de JA (Figura 3a y apéndice tabla suplementaria 1; Chini y col., 2007).

Mediante clonaje posicional se identificó el gen mutado como At3g17860. Este gen codifica JAI3/JAZ3, miembro fundacional de la familia JAZ (*Jasmonate ZIM-domain protein*; Chini y col., 2007). Se analizó por secuenciación el gen At3g17860 en el mutante *jai3-1*, y se observó que presentaba un cambio de base (G por A) en el sitio de procesamiento (*splicing*) del 5° intrón de su ARN mensajero. La secuenciación del correspondiente DNA complementario demostró que el ARN mensajero del mutante *jai3-1* carecía de los dos últimos exones del gen *JAZ3*, lo que daba lugar a la expresión de una proteína aberrante que carece del dominio Jas y poseía catorce aminoácidos adicionales codificados por el 5° intrón (figura 3b). Se obtuvieron y analizaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresaban la proteína aberrante JAZ3ΔC (aminoácidos del 1 al 298 de JAZ3, la misma proteína que en el mutante *jai3-1* sin los 14 aminoácidos extra codificados por el 5° intrón). Estas plantas presentaban insensibilidad a JA, mostrando un menor acortamiento de la raíz en presencia de dicha hormona en comparación con plántulas Col-0. Dicha insensibilidad a la hormona era similar a la de plántulas mutantes *jai3-1* (figura 3e, f, h). Esto confirmó, que esta mutación es la responsable del fenotipo dominante de insensibilidad a JA que se observa en los mutantes *jai3-1* (Chini y col., 2007). Se generaron también plantas transgénicas que sobre-expresaban la proteína JAZ3 silvestre y se observó que no presentaban insensibilidad a JA (figura 3g). Esto hace suponer que el dominio Jas tiene un papel crucial en la regulación (probablemente represión) de la actividad de JAZ3.

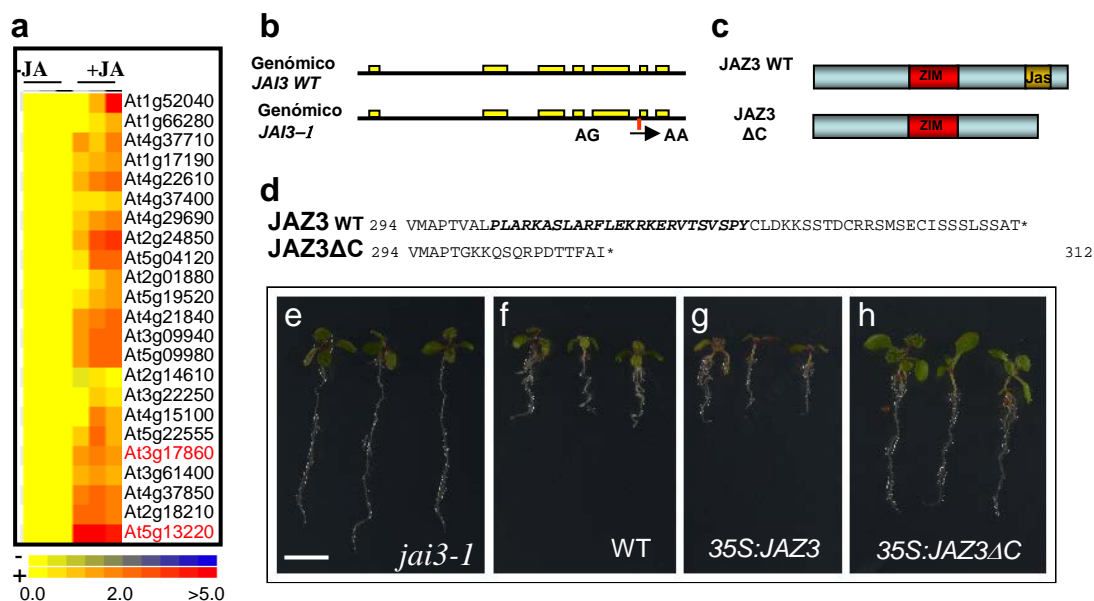


Figura 3. Identificación y caracterización de JAZ3 **a.** Resultados del análisis transcriptómico que muestra los genes diferencialmente expresados en el mutante *jai3-1* con respecto a plantas silvestres después de ser tratadas con JA (0.5, 1 y 3 horas). Los datos de regulación por JA de estos genes se obtuvieron de bases de datos públicas (http://bbc.botany.utoronto.ca/affydb/cgi-bin/affy_db_express_browser_in.cgi). Los genes JAZ están destacados en rojo. Los datos se representan en escala logarítmica. **b.** Representación esquemática de la organización genómica de *JAI3* y el mutante *jai3-1*. **c.** Representación esquemática de los dominios estructurales de las proteínas JAZ3 y JAZ3ΔC. Se muestran los dominios ZIM y Jas. **d.** Secuencia carboxilo terminal de las proteínas JAZ3 y JAZ3-1. El dominio Jas se encuentra destacado en negrita y cursiva. **e–h.** Ensayo de inhibición del crecimiento de la raíz en el mutante *jai3-1* (**e**), Col-0 (**f**), y plantas transgénicas que sobre-expresan JAZ3 (**g**) o JAZ3ΔC (**h**). Escala, 5 mm.

Aunque la identificación y caracterización de los genes *JAZ* es el objeto de estudio en esta tesis, resumo aquí algunas de sus características clave para facilitar su comprensión:

La familia JAZ es un subgrupo de la familia de proteínas TIFY, llamada así por la conservación en su secuencia del motivo TIFYXG (Vanholme y col., 2007; Bai y col., 2011). Esta familia génica es específica de plantas e incluye a proteínas presentes en plantas superiores y en musgos, pero no en algas.

En *Arabidopsis*, la familia JAZ está compuesta por 12 proteínas (figura suplementaria 1). En su estructura tiene dos dominios altamente conservados, ZIM/TIFY y Jas. El

dominio ZIM, de 37 aa, se localiza en la región amino terminal de las proteínas. Se encuentra en todos los miembros de la familia TIFY y fue descrito anteriormente en FTs como *ZIM1*, *ZIM-LIKE1* y *ZIM-LIKE2* (Nishii y col., 2000; Shikata y col., 2004).

Dentro de este dominio, la región más conservada está constituida por 6 aminoácidos que forman el motivo TIFY. Se ha descrito que el dominio ZIM interviene en la formación de homo- y heterómeros entre los represores JAZ y en la interacción con la proteína adaptadora NINJA, cuya identificación y caracterización es también objeto de esta tesis (Chini y col., 2009; Chung y Howe, 2009; Pauwels y col., 2010).

Por otra parte, el dominio Jas es una secuencia de 26 aminoácidos altamente conservada y específica de la familia JAZ que se localiza en la región carboxilo terminal. Este dominio es el responsable de la interacción con los FT y con COI (Chini y col., 2007; Thines y col., 2007; Yan et al., 2007).

La resolución cristalográfica de la estructura COI1-ASK1-JAZ reveló que COI1 y los represores JAZ son co-receptores de la hormona (Sheard y col., 2010). El dominio Jas se pliega dando lugar a una estructura bipartita que permite a los JAZ interactuar con COI1 y con la hormona de forma simultánea. Esta interacción solamente puede llevarse a cabo cuando está presente el cofactor inositol-pentakisfosfato (InsP5) (Sheard y col., 2010; Mosblech y col., 2011).

Además de su implicación en la ruta de señalización del JA, las proteínas JAZ participan en la regulación de otras vías de señalización hormonal, como las GAs o el ET. Se ha descrito que las proteínas JAZ interactúan de forma directa con los represores de la vía de señalización de las GAs, las proteínas DELLA, lo que lleva a una atenuación de la represión de las respectivas rutas hormonales que regulan. Por tanto, en presencia de GAs, las proteínas DELLA son degradadas y las proteínas JAZ podrían interactuar con MYC2 y otros FTs reprimiendo la activación de la ruta del JA. Por otro lado, el JA-Ile induce la degradación de los JAZ, permitiendo que las proteínas DELLA se unan y repriman a los FT PIF (Hou y col., 2010; Yao y col., 2011).

En el caso del ET, las proteínas JAZ interactúan con los FTs EIN3 y EIL1, inhibiendo su actividad transcripcional. Como se describe anteriormente, esta regulación es clave

para entender el sinergismo entre las hormona ET y JA en la activación de defensas (Zhu y col., 2011).

3. Objetivos

A pesar de la importancia de los jasmonatos para la defensa y el desarrollo de las plantas, el conocimiento de los mecanismos moleculares que median su señalización era muy limitado al inicio de este trabajo. El objetivo general de esta tesis era profundizar en la caracterización de la ruta de señalización de los jasmonatos, a través de la caracterización molecular del gen *JAZ3*, que como se describe en Antecedentes, acababa de ser identificado mediante la clonación molecular del mutante insensible a jasmónico, *jai3-1* (*jasmonate-insensitive3-1*). Concretamente, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Definir la función de la proteína JAZ3 y otros miembros de esta familia en la regulación de la señalización de JA.
2. Búsqueda de nuevos componentes moleculares que nos permitan avanzar en el conocimiento de esta ruta de señalización, mediante la identificación de interactores de JAZ3.

4. Resultados

3.1. La familia de proteínas JAZs y su función represora en la vía de señalización del JA

3.1.1. Caracterización molecular de JAZ3 y otras proteínas JAZs

3.1.1.1 Interacción JAZ3/COI1

La naturaleza dominante (negativa) del fenotipo de insensibilidad a JA en el mutante *jai3-1* y el tipo de mutación identificada tras la clonación posicional (pérdida de un dominio conservado), sugerían que JAZ3 podría ser un hipotético represor de la respuesta a JA, que sería eliminado por el proteasoma en presencia de la hormona, de una forma dependiente de la vía de SCF^{COI1}. JAZ3, por tanto, podría ser la primera diana conocida de SCF^{COI1}. Para demostrar esta hipótesis, primero se analizó la interacción directa entre JAZ3 y COI1 mediante ensayos de interacción proteica de tipo *Pull Down* (PD), en colaboración con Sandra Fonseca. Para ello, se seleccionó la progenie homocigota de plantas transgénicas que sobre-expresan la proteína COI1 fusionada al epítipo FLAG, se hicieron extractos proteicos y se incubaron con la proteína recombinante JAZ3 fusionada a MBP, en ausencia y presencia de COR a distintas concentraciones. Como se muestra en la figura 4, se observó interacción directa entre ambas proteínas sólo cuando la hormona está presente en el medio, siendo dicha interacción dependiente de la concentración a la cual se encuentra la hormona.

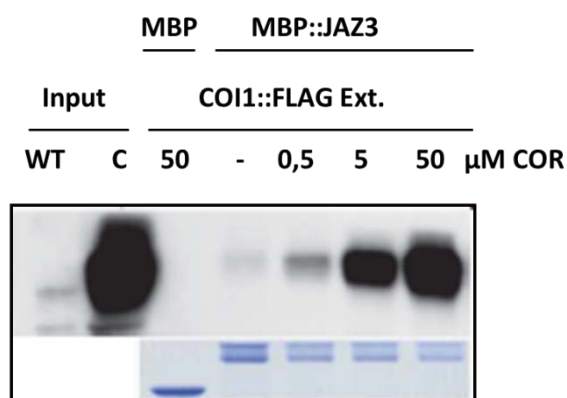


Figura 4. JAZ3 y COI1 interaccionan de forma directa en presencia de COR. Membranas de WB reveladas con anticuerpo anti-FLAG donde se detecta la proteína COI1::FLAG recuperada después de ensayos de PD donde se usaron plantas transgénicas que sobre-expresan COI1::FLAG (C) o Col-0 (WT) y proteínas recombinantes MBP o MBP::JAZ3. Estos ensayos se realizaron en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de COR (0,5, 5 y 50μM). En la línea inferior se muestran geles teñidos con Coomassie donde se observa la cantidad de proteína recombinante usada.

3.1.1.2. Interacción de otras proteínas de la familia JAZ con COI

En colaboración con Sandra Fonseca se demostró que la mayoría de las proteínas JAZs, a excepción de JAZ7 y JAZ8, son capaces de interaccionar con COI1 de forma directa en presencia de COR (50μM). Para ello se realizaron ensayos de PD usando las proteínas JAZs fusionadas a MBP y extractos de plántulas transgénicas que sobre-expresan la proteína COI1 fusionada al epítipo FLAG (figura 5). Estos resultados sugieren que al igual que JAZ3, el resto de las proteínas JAZs podrían ser dianas directas de COI1 y que dicha interacción depende de la presencia de hormona en el medio (Fonseca y col., 2009a).

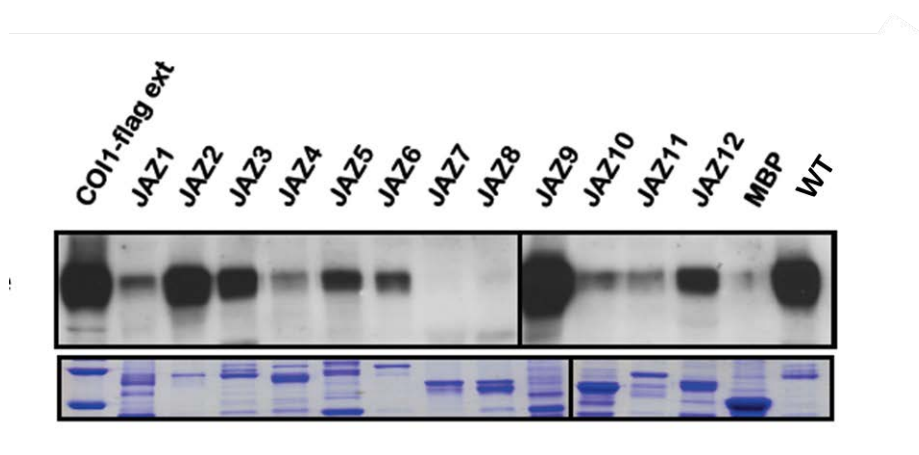


Figura 5. Interacción directa entre COI1 y las proteínas de la familia JAZ en presencia de COR. Membrana de WB revelada con anticuerpo anti-FLAG que muestra la recuperación obtenida de la proteína COI::FLAG tras ensayos de PD con las distintas proteínas JAZ1-12 unidas al epítipo MBP. Se usaron extractos proteicos de plántulas que sobre-expresan COI1::FLAG o silvestres (WT). Estos ensayos se hicieron en presencia de COR 50μM. En la línea inferior se muestran geles teñidos con Coomassie donde se observa la cantidad de proteína recombinante usada.

3.1.1.3. Degradación de JAZ3 por el proteasoma

Para comprobar si la proteína JAZ3 se degrada por la vía del proteasoma y si en esta degradación participa el complejo SCF^{COI1}, se llevaron a cabo ensayos de degradación *in vitro* con la proteína JAZ3 marcada con ³⁵S, en extractos proteicos de *Arabidopsis* silvestres y mutantes *coil-16*. Los extractos proteicos fueron obtenidos a partir de plántulas de *Arabidopsis* crecidas durante diez días en medio Johnson tratadas durante 12 horas con los tratamientos indicados para cada caso.

En ausencia de JA, la incubación de [³⁵S]JAZ3 con extractos silvestres (WT) no provocó una variación significativa en la concentración de proteína a lo largo de la incubación (figura 6). En cambio, el tratamiento con JA (50μM) indujo su degradación progresiva, de modo que, al cabo de cuatro horas, sólo quedó en el medio un 10-20% de la proteína JAZ3 inicial (figura 6). Cuando se realizó un tratamiento con MG132 (200μM), un inhibidor específico del proteasoma, no se observó degradación de [³⁵S]JAZ3 en extractos silvestres, a pesar de su tratamiento con JA (figura 6). A la vista de estos resultados, podemos afirmar que el JA promueve la degradación de la proteína JAZ3 por el proteasoma 26S.

Para demostrar que la degradación de JAZ3 requiere COI1, se llevaron a cabo ensayos de degradación *in vitro* de [³⁵S]JAZ3 en extractos mutantes de pérdida de función de COI1 (*coi1-16*). Se observó que, aún en presencia de la hormona, la cantidad de JAZ3 no variaba significativamente (figura 6).

Estos mismos ensayos se llevaron a cabo con la proteína truncada JAZ3ΔC marcada con ³⁵S, y se observó que no se degradaba en extractos silvestres tratados con JA (50μM) (figura 6a). Esto indica que el dominio Jas es esencial para la degradación de JAZ3 por el proteasoma.

Además, se realizaron ensayos de degradación *in vitro* de JAZ3 en extractos mutantes *jai3-1*. Al cabo de 4 horas, no se observa degradación de JAZ3 en presencia de JA (figura 6). De acuerdo con la naturaleza dominante de la mutación, este experimento podría indicar que la presencia de la proteína JAZ3ΔC previene la degradación de la proteína salvaje.

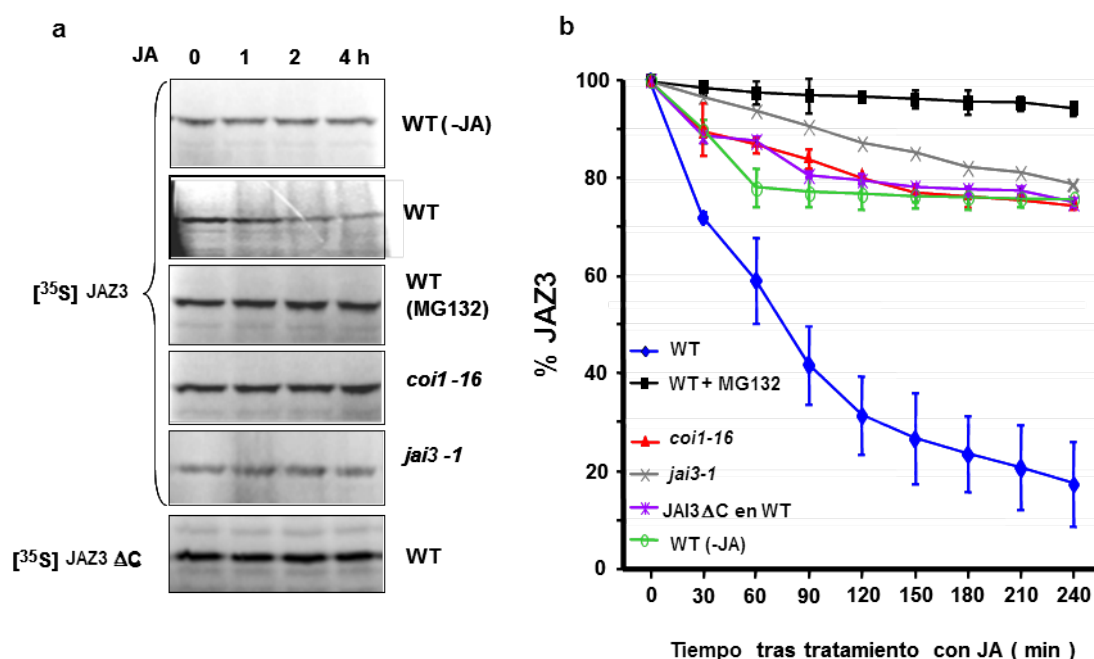


Figure 6. JAZ3 se degrada en respuesta a JA vía proteasoma de una forma dependiente de COI1 en ensayos *in vitro* **a**, Gel SDS-PAGE donde se observa la degradación gradual de las proteínas [35S]JAZ3 o [35S]JAZ3ΔC marcadas radiativamente, después de la incubación con extractos celulares de plántulas de *Arabidopsis* silvestres (Col-0), *coi1-16* o *jai3-1*, que han sido tratados con 50 mM JA y +/- 200 mM MG132, un inhibidor específico del proteasoma **b**, Gráfica donde se muestra la cuantificación de las proteínas [35S]JAZ3 y de [35S]JAZ3ΔC tras la incubación con extractos de plántulas de *Arabidopsis* silvestres, *coi1-16* y *jai3-1* a diferentes tiempos, con los tratamientos anteriormente indicados. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Los resultados anteriores fueron confirmados mediante ensayos de degradación *in vivo* realizados en colaboración con Andrea Chini. Para ello se usaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresan JAZ3::GFP en fondo silvestre y en fondo *coi1-1* (Chini et al., 2007). En primer lugar, se analizaron las raíces de plántulas de líneas transgénicas que sobre-expresan JAZ3::GFP o JAZ3ΔC::GFP por microscopía de fluorescencia. Estos ensayos confirmaron una clara localización nuclear de ambas proteínas en ausencia de tratamiento (figura 7a). Cuando estas plantas fueron tratadas con JA durante 1 hora, la proteína JAZ3::GFP se degradó, y dejó de observarse en el núcleo celular (figura 7b).

Sin embargo, el tratamiento con MG132, un inhibidor específico del proteasoma, previno la degradación de la proteína JAZ3 (figura 7c). Además, JAZ3::GFP no se degrada en un fondo mutante *coi1-16*, tanto en plántulas que no han recibido ningún tratamiento, como en aquellas que han sido tratadas con JA (figura 7d,e). Al contrario que la proteína JAZ3 completa, la integridad de la proteína truncada JAZ3ΔC::GFP no se ve afectada por tratamientos por JA (figura 7f,g).

Todos estos resultados apoyan los obtenidos *in vitro* y sugieren que el dominio Jas de JAZ3 es necesario para que se lleve a cabo la degradación de la proteína.

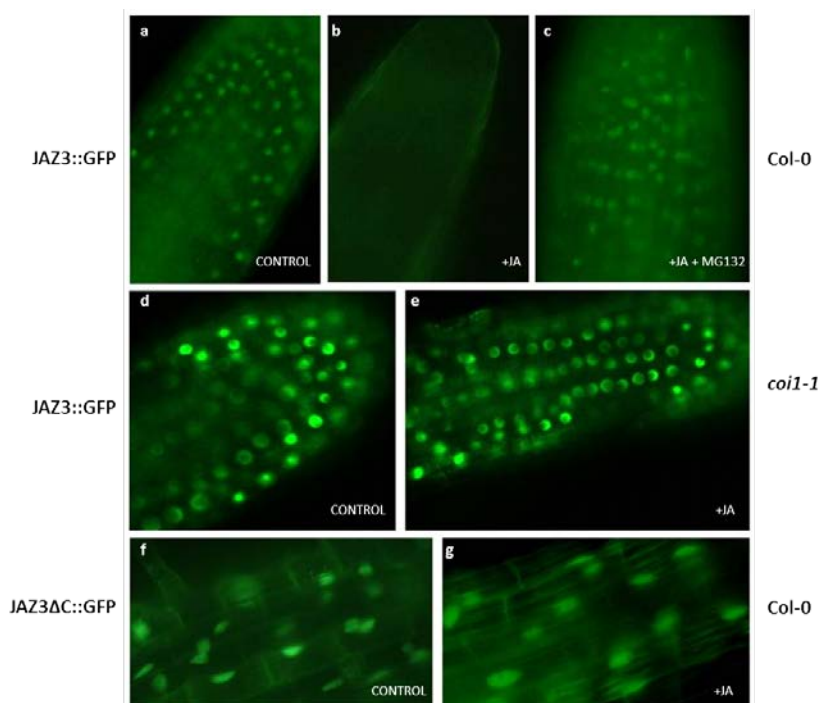


Figura 7. JAZ3 se localiza en el núcleo y se degrada vía proteasoma de una forma dependiente de COI1 en ensayos *in vivo*. Visualización por microscopía de fluorescencia de núcleos de raíces de plántulas de *Arabidopsis* que sobre-expresan JAZ3::GFP (a-e) o JAZ3ΔC::GFP (f, g) en fondo Col-0 (a-c, f, g) o *coi1-1* (d, e). Se muestran plántulas sin tratamiento (control), tratadas con JA 50 mM durante 1 h o con 100 mM del inhibidor del proteasoma MG132. Escala 10mm.

Por tanto, los resultados de los ensayos de interacción proteína-proteína y de degradación *in vivo* e *in vitro*, apoyan la hipótesis de que JAZ3 es una diana directa de COI1 y que el tratamiento con JA induce la degradación de JAZ3 por la vía del proteasoma 26S, de forma dependiente de complejos SCF^{COI1}.

3.1.1.4. Degradación por JA de otros miembros de la familia JAZ

Para comprobar si otras proteínas de la familia JAZ se degradan de una forma similar a JAZ3, se realizaron ensayos de degradación *in vitro* con las proteínas JAZ1 y JAZ9 marcadas con ³⁵S. En extractos silvestres tratados con JA (50uM), las proteínas JAZ1 y JAZ9 se degradaron a medida que aumentaba el tiempo de tratamiento (figura 8a y 8b), de una forma similar a como ocurría con JAZ3 (figura 5a y 5b). Sin embargo, en extractos mutantes *jai3-1* tratados con JA (50uM) no se observa degradación ni de JAZ1 ni de JAZ9 (figura 8a y 8b). Estos resultados apoyan la idea de que el efecto dominante de la proteína aberrante JAZ3-1 en el mutante *jai3-1* afecta no sólo a JAZ3 (figura 5), sino también a otros miembros de la familia JAZ, como JAZ1 y JAZ9.

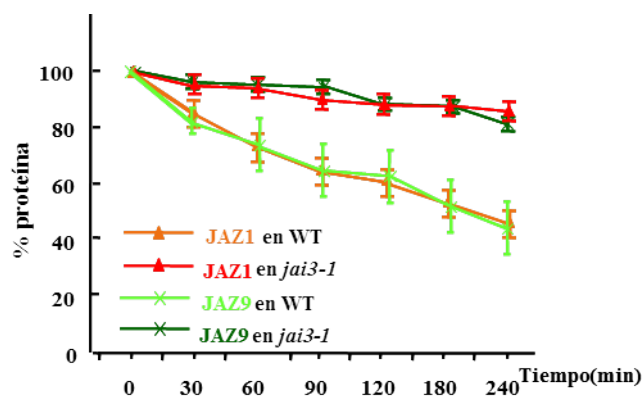


Figura 8. Degradación por JA de otros miembros de la familia JAZ. Cuantificación de las proteínas [³⁵S]JAZ1 o [³⁵S]JAZ9 tras ser incubadas a diferentes tiempos con JA. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Para comprobar el efecto del JA en la estabilidad de todas las proteínas JAZs *in vivo*, se generaron planas transgénicas que sobre-expresan cada una de las proteínas de la familia fusionadas al epítipo GUS. Se creció en medio Johnson durante siete días la progenie homocigota de cada una de las líneas transgénicas JAZ1-JAZ12::GUS y se realizaron tratamientos con JA 50μM a distintos tiempos. La medida de la actividad β-glucuronidasa de cada uno de los tiempos a los cuales fue recogido el material reflejan

que los tratamientos con JA afectan a la integridad de la mayoría de las proteínas JAZ, a excepción de JAZ7 y JAZ8. Como control de degradación se usaron plantas transgénicas que sobre-expresan la proteína GUS (figura 9).

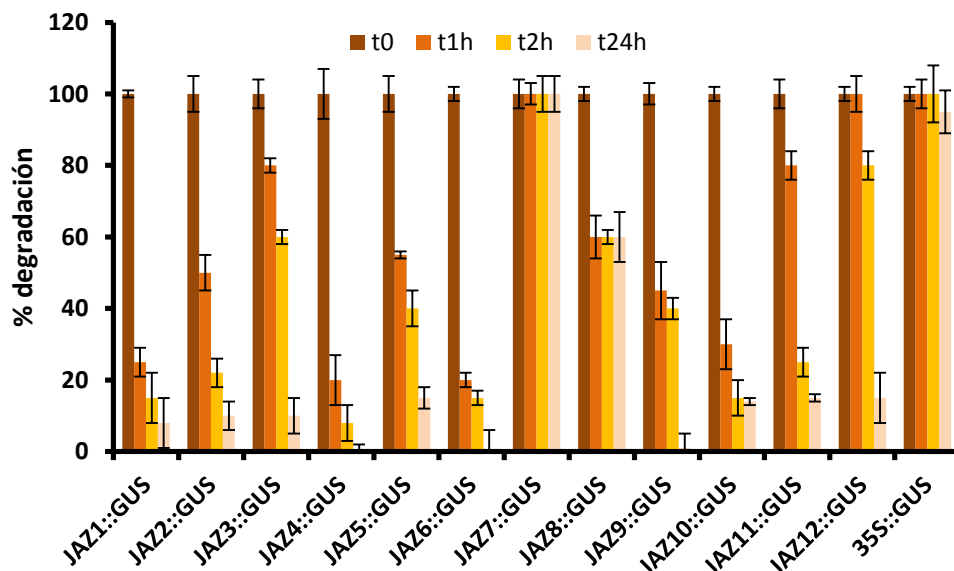


Figura 9. Ensayo de degradación por JA de las proteínas de la familia JAZ *in vivo*. Gráfica donde se muestra el porcentaje de degradación de cada una de las proteínas JAZ calculado mediante la cuantificación de la actividad β -glucuronidasa. Las muestras fueron recogidas a los tiempos indicados tras ser incubadas con JA 50uM. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

3.1.1.5. Importancia del dominio Jas en la degradación de las proteínas JAZs

Los resultados obtenidos en los ensayos de degradación *in vivo* e *in vitro* de las proteínas JAZs sugieren que el dominio Jas de éstas es necesario para que se lleve a cabo la degradación de la proteína. Para confirmarlo se realizaron ensayos de degradación con plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresan las proteínas JAZ1, JAZ2, JAZ6 y JAZ12 a las que se les ha delecionado el dominio Jas (JAZ Δ Jas) y se han fusionado al epítipo HA (apéndice figura suplementaria 1 y 2).

La progenie homocigota de las plantas transgénicas que sobre-expresan JAZ1 Δ Jas, JAZ2 Δ Jas, JAZ6 Δ Jas y JAZ12 Δ Jas se creció en medio Johnson durante 7 días, y posteriormente se realizaron tratamientos con COR 1 μ M durante 3 horas. Los resultados

de los ensayos de WB mostrados en la figura 10 reflejan que el tratamiento con COR no afecta a la integridad de las proteínas truncadas en comparación con la expresión proteica de plántulas que no han sido tratadas con COR.

Estos resultados, junto con los ensayos de degradación de las proteínas JAZ completas mostrados en la figura 9, confirmaron que el dominio Jas de las proteínas JAZs se requiere para que la hormona induzca su degradación, y por tanto se active la señalización.

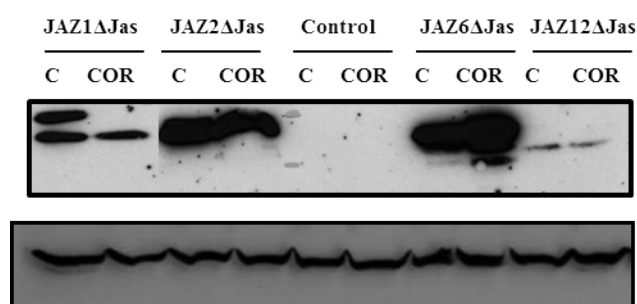


Figura 10. Las proteínas JAZΔJas no son degradadas tras tratamientos con COR. Membrana de WB revelada con el anticuerpo anti-HA de ensayos de degradación de distintas proteínas JAZΔJas tras tratamientos de 3 horas con COR 1μM (Cor) o sin ella (C). Como control negativo se usaron plántulas Col-0 (control). Como control de carga se usó la detección de la proteína actina en cada muestra. Para ello se revelaron las membranas con el anticuerpo anti-actina.

3.1.1.5.1. Análisis fenotípico de las líneas JAZΔJas

Para analizar el efecto fenotípico de la eliminación del dominio Jas en las líneas de sobre-expresión de JAZ1ΔJas, JAZ2ΔJas, JAZ6ΔJas y JAZ12ΔJas, se llevaron a cabo ensayos de inhibición de crecimiento de la raíz y acumulación de antocianinas en respuesta a tratamientos de JA en colaboración con Isabel Monte.

Para los ensayos de inhibición del crecimiento de la raíz, se crecieron en medio Johnson suplementado con JA 50μM durante 7 días plántulas de *Arabidopsis* de cada una de las líneas de sobre-expresión de las proteínas JAZs truncadas, junto con el control Col-0, *jin1-2*, *coi1-1* y *jai3-1*. Se analizó la elongación de la raíz y se observó, que las líneas de sobre-expresión de las proteínas JAZs truncadas presentaban una menor sensibilidad a la hormona, en comparación con las plantas Col-0, como reflejó el menor acortamiento de su raíz, con excepción de la línea JAZ12ΔJas (figura 11 a y b).

También se realizaron ensayos de acumulación de antocianinas. En este caso, solo la línea JAZ6ΔJas mostró diferencias estadísticamente significativas con el control WT (figura 11 a y c).

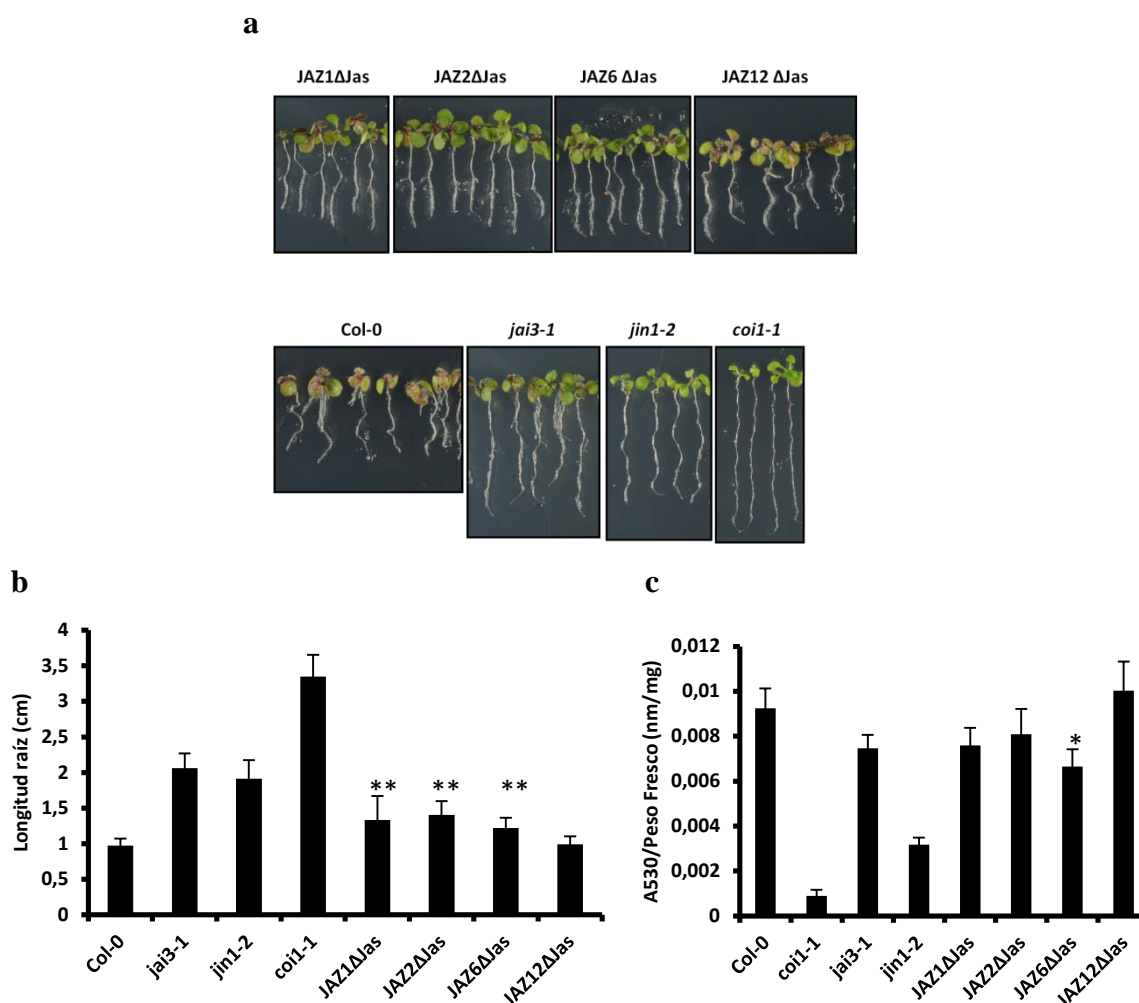


Figura 11. Análisis fenotípico de las plantas de sobre-expresión de JAZΔJas. **a.** Plántulas de *Arabidopsis* Col-0, *jin1-2*, *jai3-1*, *coi1-1* y las líneas de sobre-expresión de JAZ1ΔJas, JAZ2ΔJas, JAZ6ΔJas y JAZ12ΔJas crecidas durante 7 días en medio Johnson suplementado con JA 50μM. **b.** Análisis de la inhibición del crecimiento de la raíz de las líneas anteriores. Los datos se representan en forma de media±d.s. n=20-25 y son el resultado de tres experimentos independientes. **c.** Análisis de la acumulación de antocianinas de las líneas anteriormente citadas crecidas durante 12 días en medio Johnson suplementado con JA. Los datos se muestran como media media±d.s. n=10 y son el resultado de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la significancia estadística en comparación con Col-0 (test t de Student * $P \leq 0,05$, Student ** $P \leq 0,001$).

Estos datos indican que la eliminación del dominio Jas de distintas proteínas JAZs provoca un fenotipo de insensibilidad a la hormona similar al fenotipo del mutante *jai3-1*, y acorde con una función represora de estas proteínas JAZs.

3.1.2. JAR1 y su función en la producción de la hormona bioactiva

Hoy sabemos que JASMONIC ACIC RESISTANT (JAR1) es una enzima que cataliza la conjugación de ácido jasmónico con L-isoleucina, dando lugar a la hormona activa Jasmónico-isoleucina (JA-Ile). Por ello, los mutantes *jar1* son resistentes al efecto inhibitorio en el crecimiento de la raíz que produce el JA o Metil-Jasmónico (MeJA), pero no son resistentes a JA-Ile (Suza y Staswick, 2008). Sin embargo, al inicio de esta tesis, no se conocía la identidad de la hormona activa y solo se sospechaba la función de JAR1. Para demostrar la hipótesis de que JAR1 participa en la formación de la hormona activa, que sería en realidad el JA-Ile y no el JA o el MeJA, se realizaron ensayos de degradación *in vitro* de JAZ3 en extractos celulares del mutante *jar1-1*. Estos ensayos demostraron que la degradación de JAZ3 por JA está seriamente afectada en extractos *jar1-1*, de forma que sólo un 30-35% de la proteína se degrada (figura 12a y 12b). En cambio, cuando los extractos de *jar1* se tratan con Coronatina (COR), una fitotoxina con efectos análogos a los de JA y con una estructura similar al JA-Ile, se observa una degradación gradual de JAZ3, similar a la que ocurre tras el tratamiento con JA de extractos WT (figura 12a y 12b). Al igual que cuando se usan extractos silvestres (figura 5), no se observó degradación de JAZ3 en extractos mutantes *jar1-1* sin tratar con JA, ni en aquellos tratados con el inhibidor del proteasoma MG132 (figura 12a y 12b).

Estos resultados sugieren que la hormona bioactiva no es el JA, sino el JA-Ile y que JAR1 es la enzima responsable de su activación (conjugación de JA con Ile). Resultados de otros compañeros del laboratorio confirmaron posteriormente esta hipótesis demostrando que un estereoisómero específico de JA-Ile, concretamente, (+)-7-iso-JA-L-Ile, es la forma activa de la hormona y el producto de la reacción catalizada por JAR1 que promueve la interacción de COI1 con JAZ3 y otros JAZ, e induce su degradación por el proteasoma (Fonseca et al., 2009a).

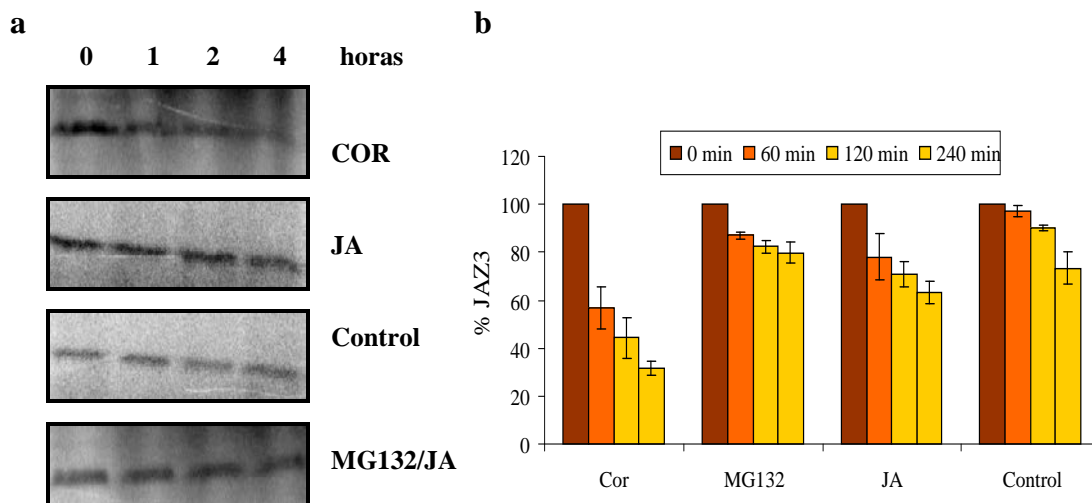


Figura12. Degradación *in vitro* de [³⁵S]JAZ3 en extractos del mutante *jar1-1*. **a.** Autorradiografía de geles de SDS-PAGE donde se muestra la proteína residual [³⁵S]JAZ3 después de incubar a distintos tiempos con extracto celular de *Arabidopsis jar1-1* tratados con COR 30uM, JA 50uM o MG132 200uM según se indica. **b.** Cuantificación de la degradación de [³⁵S]JAZ3 en extractos mutantes *jar1-1*. Los valores de la gráfica son el resultado de la media de tres ensayos independientes (+/- la desviación estándar) de degradación *in vitro* de JAZ3 en extractos celulares de mutantes *jar1-1*.

3.1.3. JAZ3 relaciona el complejo SCF^{COI} con la activación transcripcional inducida por JA

3.1.3.1. Las proteínas JAZs interaccionan con el FT MYC2

El hecho de que las proteínas JAZs carezcan de un dominio definido de unión a ADN sugiere que su hipotética función de represores transcripcionales debería ser indirecta. Esto, a su vez, sugirió la hipótesis de que las proteínas JAZs podría actuar como represores de MYC2, el activador transcripcional mejor conocido en respuesta a JA, previamente identificado en el laboratorio (Lorenzo et al. 2004). Para confirmar dicha hipótesis, se realizaron ensayos de interacción proteína-proteína de tipo PD entre las proteínas recombinantes JAZs fusionadas a MBP (MBP::JAZ1-JAZ12) y extractos de plántulas de *Arabidopsis* que sobre-expresan la proteína MYC2 fusionada a GFP. Estos ensayos, confirmaron una interacción directa entre MYC2 y todas las proteínas JAZs, a excepción de JAZ12 (figura13).

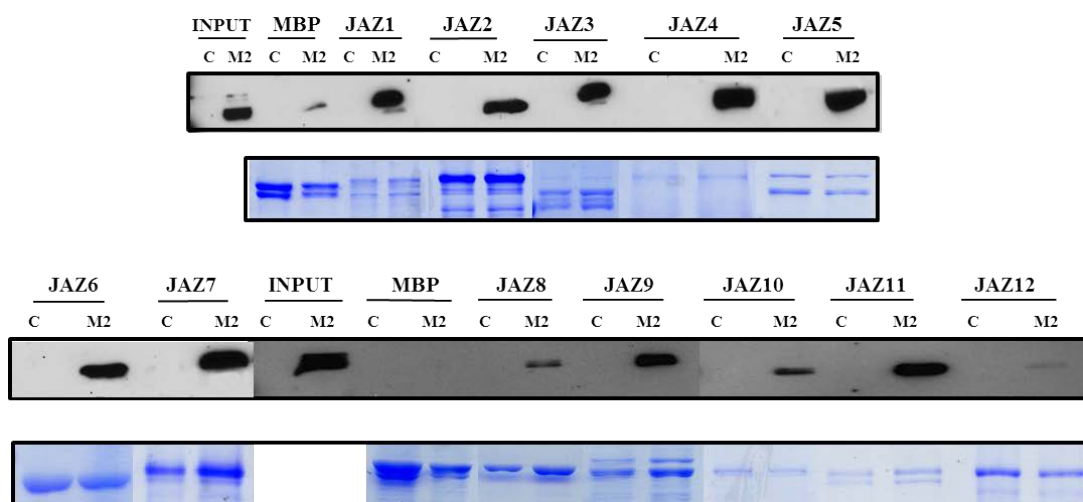


Figura 13. Interacción de las proteínas de la familia JAZ con MYC2. Membranas de WB reveladas con anticuerpo anti-GFP que muestran el resultado del ensayo de PD entre las proteínas recombinantes de la familia JAZ fusionadas a MBP (MBP::JAZ1-JAZ12) y extracto proteico de plántulas que sobre-expresan MYC2::GFP (M2) o silvestres (C). El control de carga de las proteínas recombinantes se muestra en el panel inferior mediante geles de tinción con Coomassie.

3.1.3.1.1. Mapeo de la región de interacción de JAZ3 y MYC2

De forma adicional, se llevaron a cabo ensayos de PD *in vitro* y dos híbridos en levadura en colaboración con Sandra Fonseca y Bruce Adie, que confirmaron estas interacciones y definieron las regiones de interacción entre MYC2 y JAZ3. (apéndice figura suplementaria 2b).

En ensayos de PD *in vitro*, la proteína MYC2 marcada radiactivamente interacciona con la proteína recombinante JAZ3 completa (MBP::JAI3) y con MBP::JAI3ΔN, construcción formada por el fragmento de la proteína JAZ3 que contiene el dominio Jas, pero no con MBP::JAI3ΔC, que carece de este dominio (figura 14a).

De forma similar, la proteína JAI3 marcada radiactivamente, interacciona con la proteína recombinante MBP::MYC2 completa y con MBP::MYC2ΔC, pero no con MBP::MYC2ΔN (figura 14b). Estos resultados sugieren que la interacción entre JAZ3 y MYC2 requiere el dominio Jas de JAZ3 y la región N-terminal de MYC2.

Ensayos de dos híbridos en levadura confirmaron la interacción entre MYC2 y JAZ3, y los dominios implicados (figura 14c). Dichos ensayos se llevaron a cabo co-transformando la cepa de *S. cerevisiae* AH109 con los plásmidos pDES22::MYC2, pDES22::MYC2ΔC o pDES22::MYC2 ΔN y pDES32::JAZ3 o pDES32:: JAZ3ΔN. En la figura suplementaria 2 se muestran los fragmentos completos y truncados de cada una de las proteínas que se usaron.

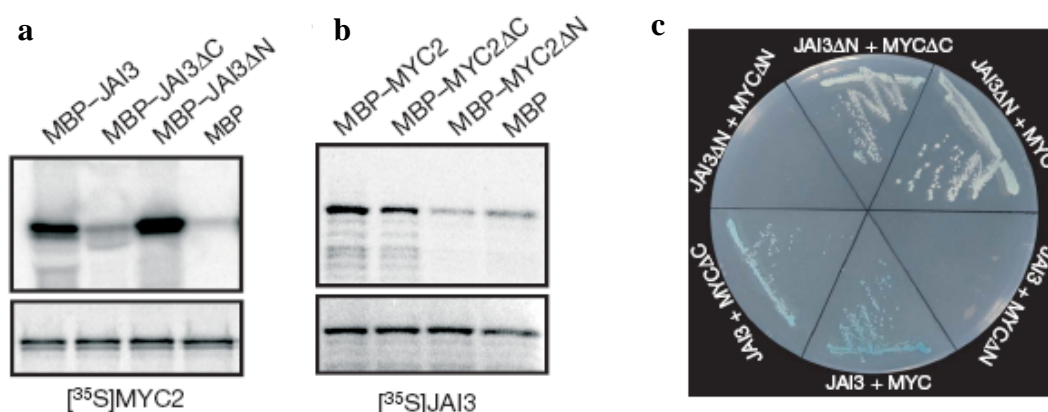


Figura 14. Mapeo de las regiones de interacción entre JAZ3 y MYC2. a-b, Ensayos PD *in vitro* entre [³⁵S]MYC2, [³⁵S]JAZ3 y los fragmentos amino y carboxilo terminal de dichas proteínas para los que se usó resinas de amilosa que contenían las proteínas recombinantes fusionadas a MBP, JAI3/JAZ3 (a), MYC2 (b) o sus respectivos fragmentos amino y carboxilo terminal (a,b). Los paneles inferiores de cada figura reflejan los controles de carga de ambos ensayos. c. Ensayo de doble híbrido entre JAI3/JAZ3 y MYC2 y sus respectivos fragmentos amino y carboxilo terminal.

3.1.3.2. Interacción de las proteínas JAZs con los FTs MYC3 y MYC4

De forma adicional, se comprobó si los FT MYC3 y MYC4, dos FT de tipo BHLH identificados en el laboratorio y que actúan de forma redundante con MYC2 en la señalización del JA (Fernández-Calvo y col., 2011; Niu y cl., 2011; Schweizer y col., 2013), podrían ser también dianas directas de las proteínas JAZs. Para ello se realizaron ensayos de PD usando las 12 proteínas MBP::JAZ recombinantes y extractos proteicos obtenidos de la progenie homocigota de plantas transgénicas que sobre-expresan MYC3::HA o MYC4::HA. Como se puede observar en la figura 15a, MYC3 es capaz de interaccionar con la mayoría de las proteínas JAZs a excepción de JAZ4 y JAZ6. Por otra parte, el FT MYC4 es capaz de interaccionar con todas las proteínas JAZs, siendo la interacción con la proteína JAZ4 débil.

Por tanto, estos ensayos de interacción proteína-proteína confirmaron que, junto con MYC2, los FT MYC3 y MYC4 son interactores directos de las proteínas JAZs, regulando esta familia de represores la activación de la transcripción génica de la señalización de JA en la que participan estos FT (Fernández-Calvo y col., 2010) (figura 15).

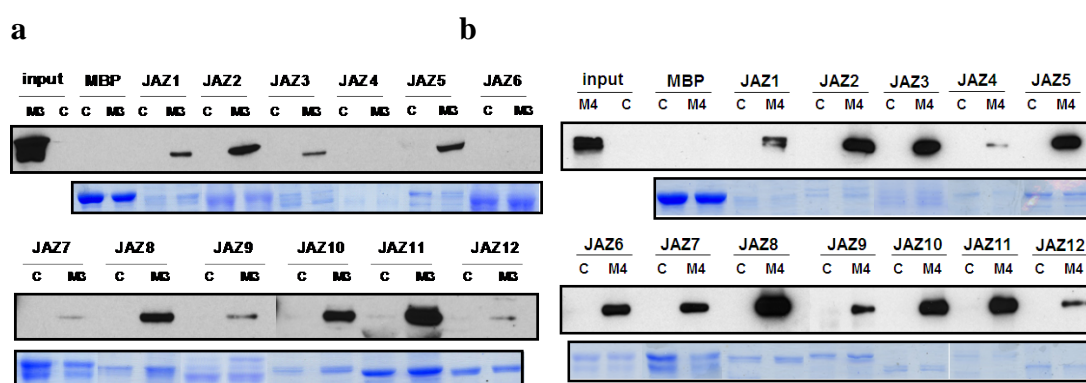


Figura 15. Interacción de las proteínas de la familia JAZ con MYC3 y MYC4. Membranas de ensayo de WB reveladas con el anticuerpo anti-HA que muestran el resultado de PD entre las proteínas recombinantes de la familia JAZ fusionadas a MBP y **a.** extracto proteico de plántulas que sobre-expresan MYC3::HA (M3) o **b.** Extracto proteico de plántulas que sobre-expresan MYC4::HA. En el panel inferior se muestra el control de carga del experimento. Como control negativo se usó la proteína MBP.

3.1.3.3. JAZ3 como regulador negativo de la función de MYC2

Para comprobar la hipótesis de que JAZ3 es un regulador negativo de la función de MYC2, se realizaron análisis transcriptómicos usando *microarrays* de *Arabidopsis* (Agilent). Para ello, se analizaron plántulas de 8 días tratadas con JA durante 30 minutos. Se analizaron los genotipos WT (Col-0), *jai3-1* y líneas transgénicas de sobre-expresión de MYC2. A partir del análisis de tres réplicas biológicas se obtuvieron los ratios de expresión relativa *jai3-1* vs. Col-0 y de OE-MYC2 vs. Col-0, para cada uno de los genes representados en el *microarray*, así como los valores de *false discovery rate* (FDR) asociados a cada valor de expresión génica. Se consideraron genes con expresión significativamente aumentada en la línea de sobre-expresión de MYC2 con respecto a Col-0, aquellos genes con un ratio (*FoldChange*) de intensidad superior a 1,5 y un valor de probabilidad ajustada FDR inferior a 0,05.

De forma análoga, la expresión génica significativamente disminuida en la línea *jai3-1* con respecto a Col-0 fue considerada para valores de *FoldChange* inferiores a -1,5 y FDR menor a 0,05. Los resultados demuestran, que la mayoría de los genes que se muestran reprimidos en plantas mutantes *jai3-1* en comparación con plantas silvestres tras ser tratadas con JA, se encuentran regulados por MYC2, ya que dichos genes se encuentran constitutivamente expresados en plantas transgénicas que sobre-expresan MYC2 (figura 16a).

Además, se analizaron las secuencias sobre-representadas en los promotores de los genes con menor expresión en mutantes *jai3-1* y se observó que las secuencias más sobre-representadas (p valor 7.19×10^{-7}) eran la caja T/G o la caja G. Dichas cajas han sido predichas como los dominios de unión a DNA de MYC2 (Boter y col. 2004; Chini y col., 2007; Godoy y col., 2011) (figura16b).

Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que JAZ3 y otros miembros de la familia JAZ se comportan como el nexo de unión entre los dos componentes de la ruta del JA mejor conocidos hasta el momento, el complejo SCF^{COI} y MYC2, uno de los factores de transcripción que regula la transcripción génica dependiente de JA.

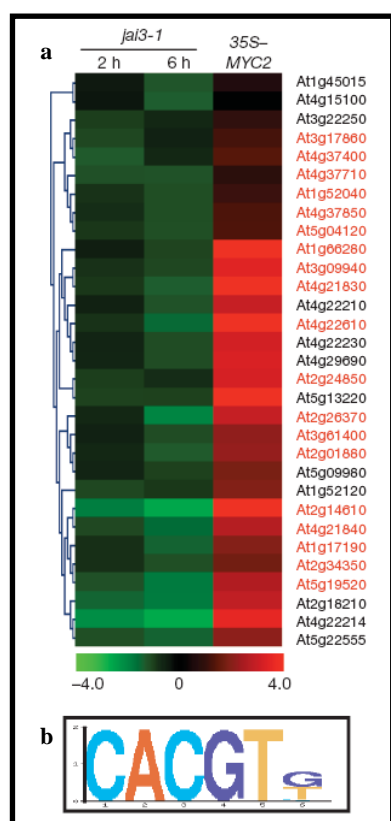


Figura 16. MYC2 y JAZ3 tienen efectos opuestos sobre la expresión génica. a. representación de los genes diferencialmente expresados en el mutante *jai3-1* cuando se compara con plántulas control Col-0 después de tratar las plántulas con JA. También se representan los niveles de expresión de estos genes en plantas de *Arabidopsis* que sobre-expresan MYC2. (apéndice tabla suplementaria 1). **b.** Secuencia diana de ADN para el FT MYC2 (caja T/G o G) que se encuentra sobre-representada en los promotores de los genes señalados en rojo en la figura a.

3.1.3.4. Regulación de los genes de la familia JAZ por MYC2

La expresión de algunos genes *JAZ* estaba alterada en el mutante *jai3-1* (Figura 3). Para analizar como se regula la expresión de los genes *JAZ* por JA y comprobar si MYC2 participa en esta regulación se realizaron análisis transcriptómicos de los genes de respuesta temprana a JA (30 minutos). Para ello, se analizaron plántulas de los genotipos Col-0, mutante *myc2* y 35S::MYC2 crecidas durante 8 días en medio Johnson y tratadas posteriormente con JA durante 30 minutos. Se analizaron tres réplicas biológicas de cada muestra, y se obtuvieron los ratios de expresión relativa del mutante *myc2* vs. Col-0, de 35S::MYC2 vs. Col-0 y de plantas Col-0 tratadas con JA vs. Col sin tratar, para cada uno de los genes representados en el *microarray*, así como los valores de FDR asociados a cada valor de expresión génica. Estos ensayos demostraron, que la expresión de 10 de los 12 genes que componen la familia JAZ están inducidos en plantas WT (Col-0) en respuesta a JA (figura 17a).

Además, el FT MYC2 parece regular la inducción por JA de la mayoría de los miembros de la familia JAZ, dado que 8 de los 10 genes de dicha familia que están inducidos por JA, se encuentran constitutivamente sobre-expresados en plantas transgénicas que sobre-expresan MYC2 y que no han sido tratadas con JA (figura 17a).

Finalmente, la expresión de siete de los diez genes que se inducen por JA de forma temprana está reprimida en plantas mutantes de pérdida de función de *myc2* que han sido tratadas con JA comparadas con plantas silvestres (figura 17a y apéndice tabla suplementaria 1).).

En *Arabidopsis* se han identificado las cajas T/G (AACGTG) y G (CATGTG), como elementos de unión a DNA de MYC2, indispensables para la expresión de genes en respuesta a JA (Guerineau y col., 2003; Brown y col., 2003; Godoy y col., 2011; Franco-Zorrilla y col., 2014). Para comprobar si en el promotor de *JAZ3*, y de otros miembros de la familia JAZ, se encontraban presentes estas cajas, se llevaron a cabo análisis de las regiones promotoras de estos genes usando el software *MotifSampler* (Thijs y col., 2001). Estos análisis demostraron que las cajas que se encuentran significativamente más sobre-representadas en los promotores de la familia JAZ son la caja G y la T/G (figura 17a).

Para demostrar que MYC2 se une a la región del promotor de *JAZ3* que contiene la caja G o T/G, se realizaron ensayos de unión a DNA y de retardo en gel de poliacrilamida (EMSA). Para ello se generaron sondas de DNA de la región del promotor de *JAZ3* que presentan la caja G o la T/G y sondas con las versiones mutadas de dichas cajas. Como se observa en la figura 17c, los ensayos de EMSA, demostraron que MYC2 se une a la secuencia del promotor que tiene la caja G o T/G pero no a las secuencias que presentan las versiones mutadas de dichas cajas. La especificidad y la afinidad de MYC por la sonda T/G se determinó mediante ensayos de competición. Al añadir concentraciones crecientes de la sonda T/G no marcada (1x, 3x y 10x) se observa competición frente a la sonda marcada. Esta competición no se observa cuando se añaden concentraciones crecientes de la sonda que presenta la versión mutada de la caja T/G. Estos resultados demuestran que *in vitro*, la caja T/G presente en el promotor de *JAZ3* es reconocida por MYC2 con una gran afinidad y especificidad.

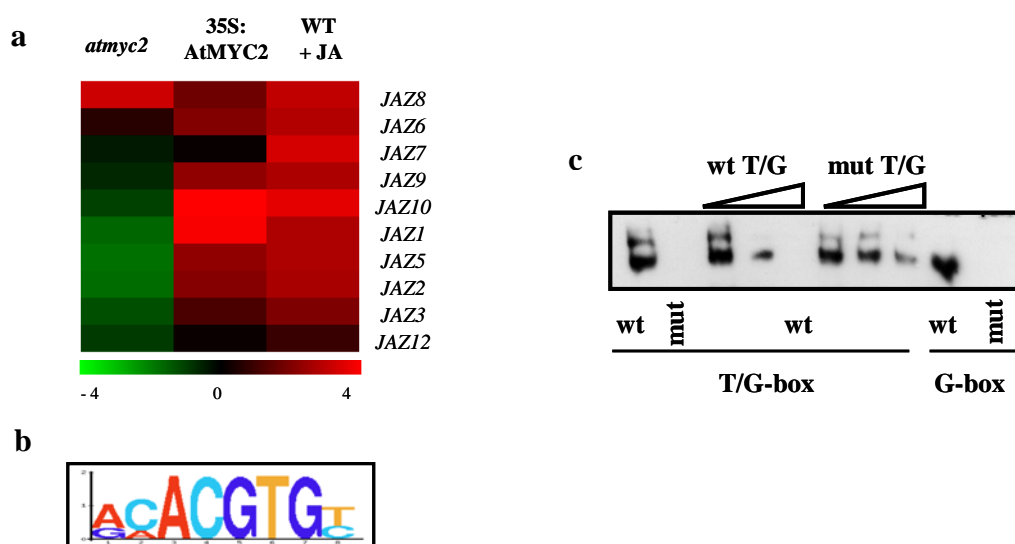


Figura 17. Regulación de la expresión de genes *JAZ* por MYC2. **a.** Representación de los datos de expresión de los genes *JAZ* en mutantes de pérdida de función *myc2* comparados con plantas Col-0 tras tratamientos con JA, en plantas de sobre-expresión 35S::MYC2 frente a plantas Col-0, ambas sin tratamiento y en plantas Col-0 tratadas con JA frente a plantas que no recibieron tratamiento (apéndice tabla suplementaria 1). **b.** Secuencia significativamente sobre-representada en los promotores de los genes de la familia *JAZs* que incluye las cajas G y T/G. **c.** Bandas de retardo de un ensayo EMSA donde MYC2 se une a la región promotora de *JAZ3* que contiene la caja G o T/G (WT) o sus versiones mutantes (MUT). Las sondas sin marcar de la caja T/G (representadas en la parte superior de la figura) se usaron en concentraciones crecientes (1X, 3X y 10X), y las sondas representadas en la parte inferior de la figura se marcaron con biotina.

3.2. NINJA interacciona con los represores JAZs y está implicado en la modulación de la respuesta a JA

3.2.1. Búsqueda de nuevos componentes de la vía de señalización de JA

3.2.1.1. Cribado en levaduras usando como cebo JAZ3

Con el objetivo de descubrir nuevos componentes de la ruta de señalización del JA, se realizó un cribado mediante el sistema de dos híbridos de levaduras, usando como cebo la proteína JAZ3. Para ello se utilizó una librería de ADNc del genoma completo de *Arabidopsis* clonado en el vector pGADT7 (GAL4, dominio de activación (DA)) y JAZ3 clonado en el vector pGBKT7 (GAL4, dominio de unión (DU)) obtenida en el laboratorio del Prof. Paz-Ares. Estas proteínas fueron expresadas en dos cepas de levadura haploides con tipos de *mating* diferente, AΔ109 (MATα) para la genoteca, e Y187 (MATα) para JAZ3. Se combinaron y se crecieron en medio selectivo SD agar (-Trp-Leu-His-Ade) con 20mM de 3AT (3-amino triazol), para eliminar posibles falsos positivos. Los aminoácidos triptófano (Trp) y leucina (Leu) son los marcadores de auxotrofia de los plásmidos pGBKT7 y pGADT7, respectivamente. La adenina (Ade) e histidina (His) son los marcadores de auxotrofia que dan la especificidad de la interacción.

Las colonias que crecieron en el medio selectivo SD agar (-Trp-Leu-His-Ade) se chequearon mediante el test de la β-galactosidasa. Aquellas que dieron positivo, se crecieron en medio SD (-Leu) para seleccionar el plásmido en el que está clonada la genoteca. Se extrajo el plásmido según los protocolos convencionales y con ellos se transformó la cepa DH5α de *E. Coli*. Se extrajeron los plásmidos nuevamente y se secuenciaron.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas de los plásmidos extraídos de las colonias positivas se alinearon con el programa BLAST. Así se obtuvieron las secuencias con mayor grado de homología que corresponden a las proteínas que interaccionaron con JAZ3 (tabla 1).

Clones positivos		nº repeticiones
<i>AFP2-Like 2</i>	At4g28910	5
Inmunofilina	At1g20810	4
CXIP2	At2g38270	2
Tiorredoxina	At4g03520	2
ATPAP19	At3g46120	1
ATPAP3	At1g14700	1
LOBD41	At3g02550	2
MYC2	At1g32640	2
MYC3	At5g46760	1
Proteína desconocida	At5g17350	3
Rubisco	At1g67090	2
Citocromo B561	At1g14730	1
ATC	At2g27550	1
DNA Polimerasa	At2g42120	1
Mirosinasa	At1g54000	1
HEL	At3g04720	1
Proteína fluorescente Cloroflica	At5g23120	1
Factor Gametofítico 2	At5g48030	1
Piruvato Deshidrogenasa Kinasa	At3g06483	1
Proteína con dominio mefrina	At5g26280	1
Expansina	At4g17030	1
GDSL	At1g29660	1
SCPL16	At3g12220	1
Oxidorreductasa	At5g24530	1

Tabla 1. Proteínas obtenidas en el cribado de posibles interactores de JAZ3. Además de los posibles interactores, en la tabla se indica en número de clones independientes obtenidos en el cribado.

Para eliminar posibles falsos positivos, en primer lugar, se chequeó la auto-activación de cada uno de los plásmidos pGADT7 que contienen los fragmentos de las secuencias que codifican para las proteínas que mostraron interacción. Para ello se crecieron levaduras de la cepa AΔ109 transformadas con cada uno de los plásmidos, en medio selectivo SD agar (-Leu-Ade-His) y en presencia de concentraciones crecientes de 3-AT (5, 10, 20 y 40mM). No se observó crecimiento de colonias en ningún caso, y por tanto, la interacción entre ellas y JAZ3 puede considerarse positiva.

De entre todas las proteínas que interaccionaron con JAZ3, se realizó una selección de aquellas que pudieran tener mayor implicación en la regulación de la vía de los JA y se comprobó de nuevo su interacción con JAZ3 y otros miembros de la familia JAZ, mediante una transformación independiente de las levaduras. Los resultados de dichas interacciones se muestran en la tabla 2, y son el resultado de experimentos realizados por triplicado. No todas las proteínas que interaccionaron con JAZ3 lo hicieron también con otros miembros de la familia JAZ (tabla2). Uno de los positivos era MYC3 (at5g46760), que es un FT muy cercano filogenéticamente a MYC2. Resultados posteriores de otros miembros del grupo demostraron que MYC3 es también una diana de los represores JAZs que regula respuestas a JA de forma parcialmente redundante con MYC2 (Fernández-Calvo y col., 2011).

A diferencia de MYC3, que interaccionó con todas las proteínas JAZs probadas, otros positivos solo lo hacen con algunas, como por ejemplo ATPAP3 (At1g14700) y LOBD41 (At3g02550), y otras lo hacen con muchas pero no con todas, como por ejemplo MYC2 y la proteína *AFP2-like 2* (at4g28910). Estos resultados sugieren que distintos JAZs podrían regular de forma específica la actividad de distintos FT lo que permitiría responder a la planta de forma concreta ante un determinado estímulo.

	pGBKT7 (B.D.)									
Clones positivos pGADT7 (A.D.)	JAZ1	JAZ2	JAZ3	JAZ5	JAZ7	JAZ8	JAZ9	JAZ10	JAZ11	JAZ12
Inmunofilina	✓	×	✓✓	×	×	✓	×	×	×	✓
Tiorredoxina	✓	✓✓	✓✓	×	✓✓	×	✓	×	✓	×
<i>AFP2-LIKE 2</i>	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	×	×	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓
Proteína desconocida	✓	✓	✓✓	✓	×	✓	✓	✓✓	✓✓	×
MYC2	✓	✓✓	✓✓	×	×	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓
MYC3	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓	✓✓	✓✓	✓
ATPAP3	×	×	✓✓	×	×	×	×	✓	✓	×
Proteína con dominio mefrina	✓✓	✓	✓✓	×	✓✓	✓✓	✓✓	✓	×	×
ATPAP19	✓	✓	✓✓	×	×	×	✓	×	×	×
CXIP2	✓	×	✓✓	×	✓✓	✓✓	✓	✓	×	×
LOBD41	×	×	✓	×	×	×	✓	×	×	✓

Tabla 2. Ensayo de doble híbrido entre clones positivos del cribado y varias proteínas JAZs. Los símbolos ✓, ✓✓ y x indican interacciones positivas débiles o fuertes, o negativas, respectivamente. Los ensayos se hicieron por triplicado.

3.2.1.2. TAP-tagging usando como cebo JAZ1, JAZ3, JAZ5 y JAZ7

Paralelamente, se llevaron a cabo experimentos de TAP-tagging, en colaboración con los grupos de Geert de Jaeger y Alain Goossens (VIB, Gante), que permitieran encontrar nuevos interactores de los JAZs, y cotejarlos con los obtenidos por la técnica del cribado en levaduras. Estos ensayos, permiten un eficiente aislamiento e identificación de complejos proteicos a partir de suspensiones celulares de *Arabidopsis*, usando para ello proteínas cebo marcadas con un doble epítipo. Para ello se clonaron las secuencias codificantes completas de JAZ3, JAZ5 y JAZ7 en el vector destino pKCTAP y con ellas se generaron líneas estables de protoplastos de *Arabidopsis* que expresaban cada una de las proteínas de interés fusionadas al epítipo GS en sus extremos amino o carboxilo terminal. El ensayo de TAP-tagging fue realizado en cultivos celulares sin tratar con JA. Asimismo, JAZ1 se había clonado ya en el laboratorio de A. Goossens, y en su laboratorio se llevó a cabo el ensayo de TAP-tagging de JAZ1 en cultivos celulares tratados y sin tratar con JA durante 1 minuto.

Numerosas proteínas interaccionaron con cada una de las proteínas JAZs, y los candidatos fueron identificados mediante técnicas de espectrometría de masas. En primer lugar, JAZ1::TAP y JAZ5::TAP formaron complejos con JAZ12. Estos resultados apoyan los datos publicados sobre la hetero-dimerización de las proteínas JAZs (Chini y col., 2009). Además, de forma coincidente con los resultados de levadura, JAZ1::TAP, JAZ3::TAP y JAZ5::TAP formaban complejos con MYC3. Es destacable, que JAZ3 y JAZ5 fueron capaces de formar complejos con TPL, un co-represor descrito para la vía de señalización de las auxinas (Long y col., 2006). Además, COI1 es capaz de formar complejos con JAZ1, pero sólo en presencia de JA (tabla 3), lo cual es consistente también con resultados previos (Thines y col., 2007; Fonseca y col., 2009a).

	ATG	Proteína	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1 (+JA)	Exp 2 (+JA)	Exp 3 (+JA)	TOTAL
JAZ1	At4g28910	NINJA	1	1	1	1	1		5
	At5g46760	MYC3		1	1	1	1		4
	At5g20900	JAZ12	1	1		1		1	4
	At2g39240	COI1				1		1	2

	ATG	Proteína	Exp 1 (C)	Exp 2 (C)	Exp 3 (N)	Exp 4 (N)	TOTAL
JAZ3	At4g28910	NINJA	1	1	1	1	4
	At3g11630	Peroxirredoxina	1	1			2
	At5g46760	MYC3	1				1
	At5g06290	Peroxirredoxina B	1				1
	At1g15750	TOPLESS		1			1
	Atg80490	TPR1		1			
	At3g11910	UBP13		1			1
JAZ5	At5g20900	JAZ12	1	1	1	1	4
	At5g13530	KEG	1	1	1	1	4
	At4g28910	NINJA	1	1	1	1	4
	At1g23190	Fosfoglucomutasa	1	1	1	1	4
	At3g11630	Peroxirredoxina	1	1	1	1	4
	At1g43800	Acil-Desaturasa	1		1	1	3
	At1g15750	TOPLESS	1	1			2
	At1g74950	JAZ2			1	1	2
	At5g46760	MYC3			1		1
	At3g16830	TPR2	1				1
	At5g27030	TPR3	1				1
JAZ7	At2g45290	Transquelotasa		1			1
	At3g43190	SUS4		1			1
	At3g01280	VDAC1		1			1

Tabla 3. Interactores de las proteínas JAZ1, JAZ3, JAZ5 y JAZ7 obtenidos mediante Tap-tagging. Los interactores obtenidos cuando se usan las proteínas JAZ3, JAZ5 y JAZ7 como presa son el resultados de 4 experimentos independientes, dos de ellos con las proteínas fusionadas al tag en posición carboxilo terminal (C) y dos con fusión amino terminal (N). Los interactores obtenidos cuando se usa JAZ1 como presa son el resultado de 6 experimentos independientes, con o sin tratamiento con JA.

Cabe destacar, que todos los JAZs testados por TAP-tagging, a excepción de JAZ7, formaron complejos con una proteína codificada por el locus At4g28910, denominada *AFP2-LIKE 2*. Además, dicha proteína fue también la más representada en el cribado de dos híbridos de levadura, en el que se usó JAZ3 como cebo. Consecuentemente, este trabajo se centró en caracterizar esta proteína de función desconocida y que renombramos como NINJA (*Novel INteractor of JAz proteins*).

3.2.2. Caracterización molecular de la proteína NINJA

3.2.2.1. Localización subcelular y estabilidad de la proteína NINJA por JA

NINJA está relacionada con la familia de proteínas AFP (*ABI-Five binding Protein*), que está formada por cuatro miembros en *Arabidopsis*: AFP1 (At1g69260), AFP2 (At1g13740), AFP3 (At3g29575) y AFP4 (At3g02140) y que han sido descritos como reguladores negativos de la vía de señalización de ABA que promueven la degradación de ABI5 (García y col., 2008).

En distintos trabajos se ha descrito que AFP1 (López-Molina y col., 2003), AFP4 (Huang y Wu, 2007) y AFP2 (García y col., 2008) presentan localización nuclear. Para investigar la localización subcelular de NINJA, se generaron plantas transgénicas que sobre-expresan NINJA fusionada a GFP en su dominio carboxilo terminal. Se analizó la expresión génica de varias líneas independientes de la progenie T2 mediante ensayos tipo *Northern* para comprobar los niveles de sobre-expresión de *NINJA*. Se eligieron las líneas OE1 y OE2, que según se muestra en la figura 18a presentaron elevados niveles de expresión para *NINJA*, en comparación con la línea control Col-0.

Seguidamente, se analizaron las raíces de plántulas transgénicas de las líneas NINJA::OE1 y NINJA::OE2 por microscopía de fluorescencia. Dichos ensayos confirmaron que NINJA presentaba una clara localización nuclear (figura 18b), de igual manera que las proteínas de la familia JAZ y AFP (López-Molina y col., 2003; Chini y col., 2007; Huang and Wu, 2007; García y col., 2008).

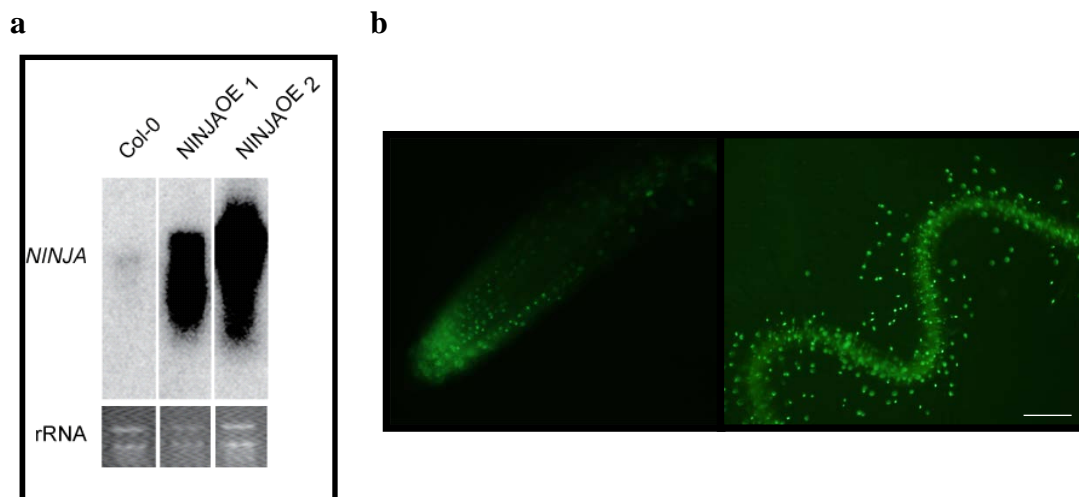


Figura 18. Expresión y localización de NINJA. a. Análisis de la expresión génica mediante ensayos tipo *Northern* de dos líneas transgénicas de plantas de *Arabidopsis* que sobre-expresan NINJA (OE1 y OE2) comparadas con plántulas silvestres Col-0. Se extrajo ARN de hojas de plantas crecidas en tierra durante tres semanas y se cargaron 8 µg de ARN total por ensayo. b. Visualización por microscopía de fluorescencia de núcleos de raíces de plántulas de *Arabidopsis* que sobre-expresan NINJA::GFP. Escala 10mm.

La expresión de los genes de la familia AFP es inducible por ácido abscísico (ABA; García et al., 2008). En colaboración con el grupo del Dr. Alain Goossens, se llevó a cabo el análisis de los datos transcriptómicos en los que se estudiaron los niveles de expresión de NINJA en respuesta a tratamientos con ABA o MeJA. Estos análisis confirmaron que en respuesta a ABA se induce la expresión de todos los genes de la familia AFP, pero que dicha hormona no tiene ningún efecto en los niveles de expresión de NINJA (figura 19a).

Se analizaron los niveles de expresión de NINJA mediante PCR cuantitativa en respuesta a tratamientos con MeJA en plántulas de *Arabidopsis*, y se observó que la inducción de NINJA comienza 1 hora después del tratamiento con JA, y se mantiene hasta 12 horas después de éste (figura 19b). Por el contrario, la expresión de MYC2 y JAZ1 es inducida por la hormona a tiempos mucho más cortos y su expresión es transitoria (figura 19b). Este patrón corresponde con el previamente identificado en un cribado de transcritos inducibles por MeJA para un homólogo de NINJA en plantas de *Nicotiana tabacum* (Gosseens, 2003).

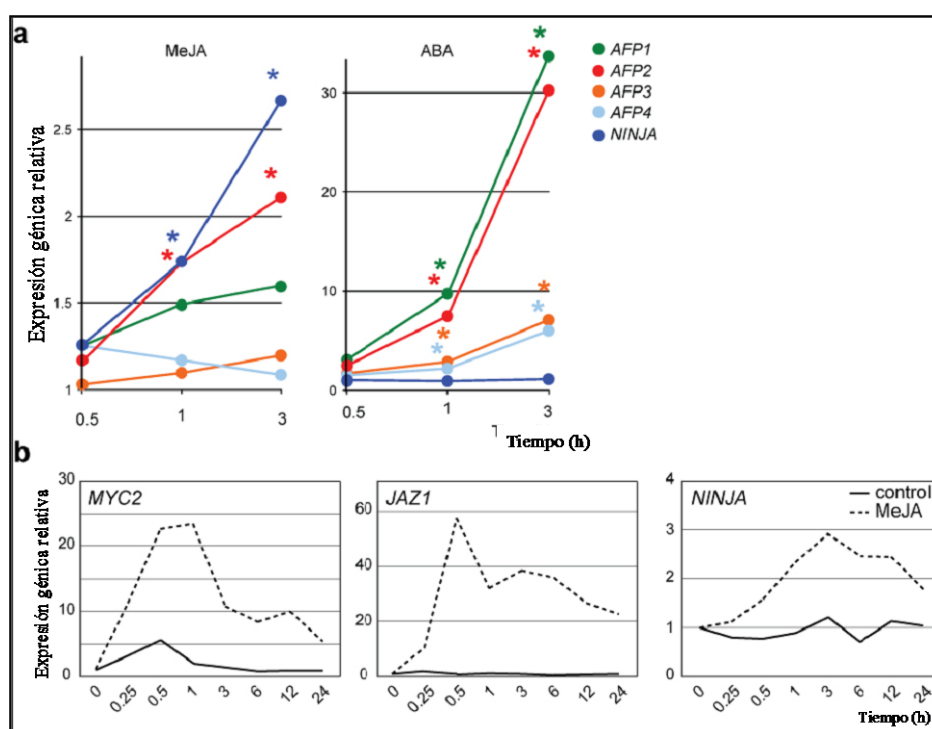


Figura 19. La expresión de NINJA se induce por MeJA pero no por ABA **a.** Análisis transcriptómico de la expresión de *NINJA* y los otros miembros de la familia *AFP* en respuesta a MeJA y ABA en plántulas de *Arabidopsis* de 7 días. Los asteriscos indican niveles de expresión diferencialmente significativos ($p\text{-valor} \leq 0.05$). **b.** Análisis de los datos de PCR cuantitativa en tiempo real de la expresión de *MYC2*, *JAZ1* y *NINJA* durante 24 horas en respuesta a 25 μM MeJA (línea discontinua) o control (línea continua).

Para analizar el efecto del JA sobre la estabilidad de la proteína NINJA, se crecieron de plántulas de *Arabidopsis* que sobre-expresan NINJA::GFP (o JAZ1::GFP como control), en presencia de MeJA (25 μM) durante 3 horas (o media hora en el caso de JAZ1). También en colaboración con el grupo de A. Goossens, se analizaron las raíces de las plántulas mediante microscopía de fluorescencia, y se observó que los niveles de NINJA permanecen constantes después de tres horas de tratamiento con MeJA, mientras que los niveles de JAZ1::GFP bajaron drásticamente sólo cinco minutos después del tratamiento con la hormona (figura 20). Esto sugiere que, de forma contraria a las proteínas JAZs, la estabilidad de la proteína NINJA no se ve afectada por la presencia de JA.

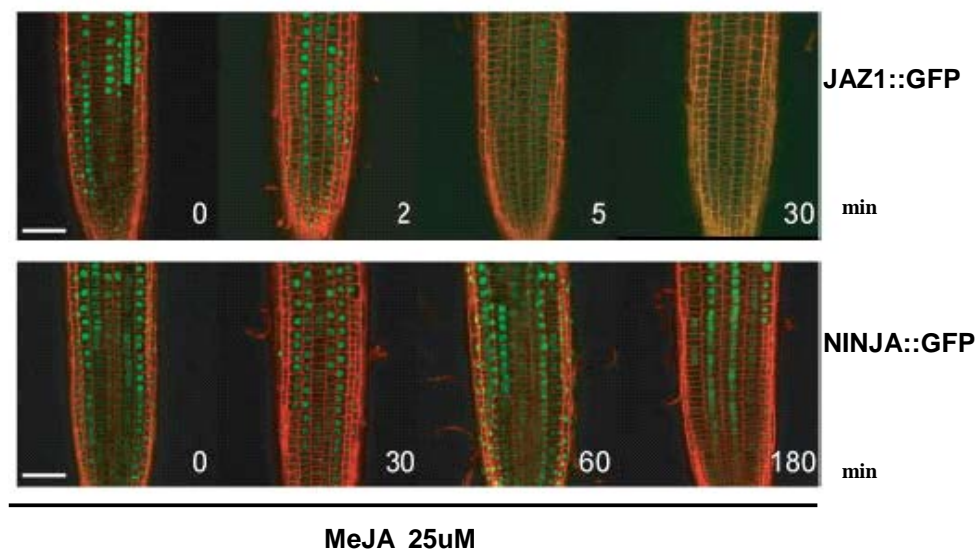


Figura 20. Estabilidad de NINJA::GFP en respuesta a MeJA. Imágenes de microscopía confocal de las raíces de plántulas de *Arabidopsis* que sobre-expresan JAZ1::GFP o NINJA::GFP. Se realizaron tratamientos con 25 μ M MeJA durante los tiempos indicados y se tiñeron con ioduro de propidio para poder visualizar el límite celular. Escala 50 μ m.

3.2.2.2. Mapeo de los dominios proteicos de interacción de NINJA con las proteínas de la familia JAZ

El hecho de que NINJA interaccione de forma directa con JAZ3 en el ensayo de cribado por dos híbridos en levaduras (tabla 1) y que forme complejos con otros miembros de la familia JAZ en los ensayos de TAP-tagging, nos llevó a estudiar la especificidad de la interacción de NINJA con el resto de las proteínas de la familia JAZ. Para ello, se realizaron ensayos de dos híbridos en levaduras usando como cebo las proteínas JAZs. Se clonaron las regiones codificantes de dichas proteínas en el vector pGBKT7 y se co-transformaron en la cepa AH109 de *S. cerevisiae*, con el plásmido PGADT7 que contiene la secuencia codificante de la proteína NINJA. Dicho análisis confirmó que NINJA interaccionaba con la mayoría de las proteínas JAZs, excepto con JAZ7 y JAZ8 (figura 21a).

Además, se realizaron experimentos de PD con las proteínas JAZs fusionadas a la proteína de unión a maltosa en su extremo amino terminal (MBP::JAZ) y extractos de plantas transgénicas que sobre-expresan la proteína NINJA fusionada a la proteína fluorescente verde (NINJA::GFP). Estos experimentos confirmaron los resultados obtenidos en los ensayos de dos híbridos en levadura. La mayoría de proteínas JAZs

fusionadas a MBP son capaces de formar complejos proteicos con la proteína NINJA. Las excepciones fueron JAZ7, JAZ11 y JAZ12 (figura 21b).

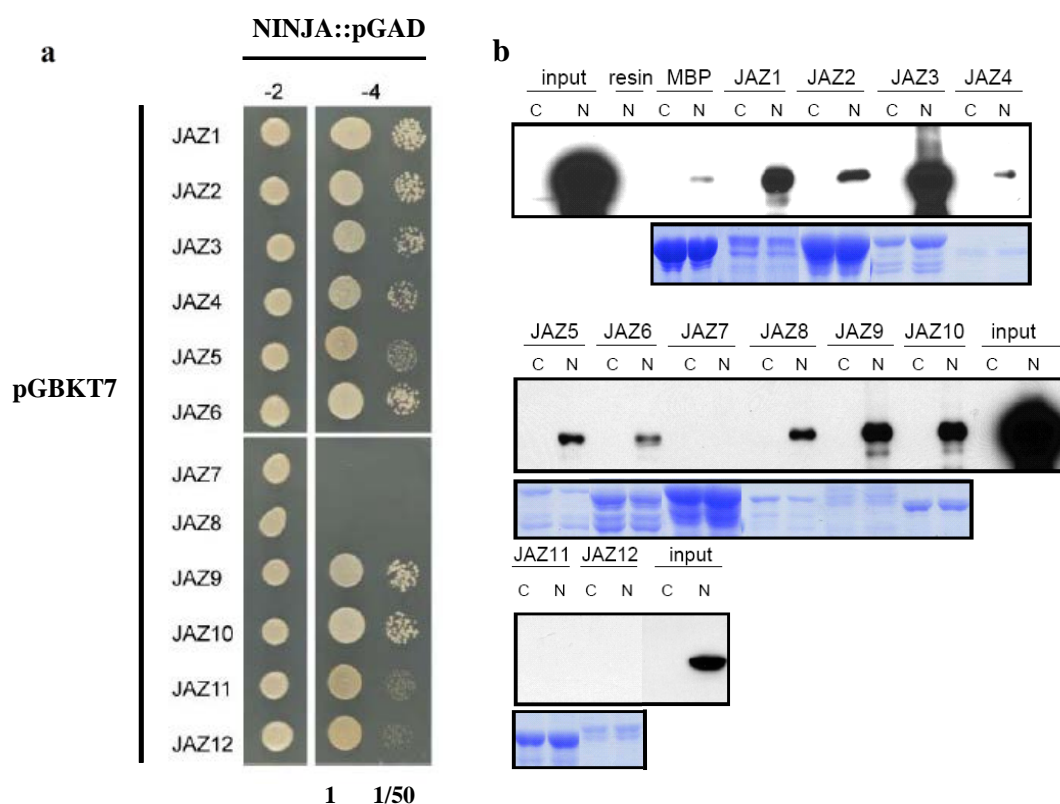


Figura 21. Interacción de NINJA con las proteínas de la familia JAZ. **a.** Ensayo de doble híbrido en la cepa AH109 de *S. cerevisiae* donde se co-transformaron los plásmidos pGADT7::NINJA y pGBKT7::JAZ (JAZ1-JAZ12). Los transformantes fueron sembrados en medio mínimo SD-Leu-Trp como control de crecimiento (-2). Para confirmar las posibles interacciones entre las proteínas usadas, las levaduras co-transformadas fueron sembradas en medio selectivo SD-Leu-Trp-His-Ade (-4) sin diluir y diluidas 50 veces. **b.** Membranas de Western blot reveladas con anticuerpo anti-GFP donde se observa la proteína NINJA::GFP recuperada después de ensayos PD donde se usaron plantas transgénicas que sobre-expresan NINJA::GFP (N) o Col-0 (C) y proteínas recombinantes MBP o MBP::JAZ. En la línea inferior se muestran geles teñidos con Coomassie donde se observa la cantidad e proteína recombinante usada.

Para mapear la región específica de interacción de las proteínas JAZs con NINJA, se realizaron ensayos de PD. Para ello, se generaron dos fragmentos de la proteína JAZ3 fusionados a la proteína de unión a la maltosa (MBP): el fragmento carboxilo terminal, que contiene el dominio Jas (MBP::JAZ3C) y el fragmento amino terminal, que contiene el dominio ZIM/TIFY (MBP::JAZ3N). Dichos fragmentos se incubaron con extractos de plantas transgénicas que sobre-expresan la proteína NINJA fusionada a la

proteína fluorescente verde (NINJA::GFP). Se observó, que únicamente el fragmento de JAZ3 que contiene el motivo TIFY (JAZ3N), es capaz de interactuar con NINJA (figura 22).

Para comprobar si NINJA es capaz de homo-dimerizar, se realizaron ensayos de PD con plantas transgénicas que sobre-expresan NINJA::GFP y la proteína recombinante NINJA fusionada a MBP en su extremo amino terminal. Como se observa en la figura 22, NINJA no fue capaz de formar homodímeros.

Adicionalmente, en estos mismos ensayos de PD, se comprobó que NINJA::GFP no es capaz de interactuar con las proteínas recombinantes MBP::COI ni MBP::MYC2 (figura 22).

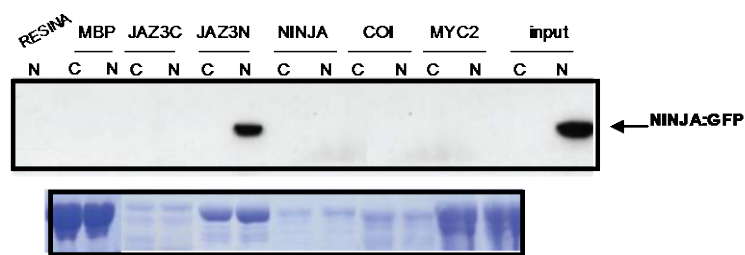


Figura 22. NINJA interactúa con JAZ a través del dominio ZIM y no forma homo-dímeros ni interactúa con COI1 ni MYC2. Membrana de WB revelada con anticuerpo anti-GFP donde se observa la proteína NINJA::GFP recuperada, después de ensayos de PD donde se usaron plantas transgénicas que sobre-expresan NINJA::GFP (N) o Col-0 (C) y proteínas recombinantes MBP o NINJA, COI1 y MYC2 fusionadas a MBP. En la línea inferior se muestran geles teñidos con

En colaboración con el laboratorio del Dr. Alain Goossens, se llevaron a cabo ensayos de dos híbridos en levadura con distintas delecciones de la proteína JAZ1 que confirmaron los resultados de PD. Como NINJA sola fue capaz de interactuar con el fragmento de JAZ1 que contiene el motivo TIFY (figura 23). Las proteínas JAZs pertenecen a la familia TIFY, caracterizadas por poseer el motivo TIFY (TIF [F/Y]XG) dentro del dominio ZIM. De forma adicional, se observó que un fragmento de 39 aminoácidos que contiene el dominio conservado TIFY de JAZ1 es suficiente para mantener la interacción con NINJA (figura 23). Consecuentemente, NINJA no fue capaz de interactuar con la proteína de fusión JAZ1 a la que se le había delecionado la secuencia TIFYAG (residuos 128 a 133; Δ tify) (figura 23).

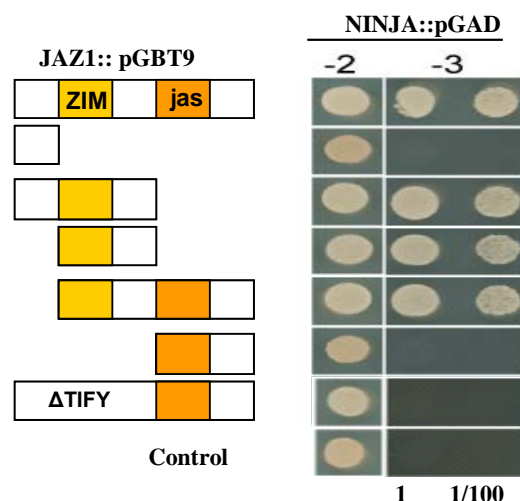


Figura 23. NINJA interacciona con el dominio TIFY de las proteínas JAZ. Ensayo de doble híbrido en levadura en la cepa PJ69-4A de *S. cerevisiae* donde se co-tranformaron los vectores pGBT9::JAZ1 o los distintos fragmentos de JAZ1 especificados (BD) y pGAD424::NINJA (AD). Las colonias transformantes fueron sembradas en medio mínimo SD-Leu-Trp como control de crecimiento de la levadura (-2) y las interacciones entre las proteínas usadas fueron comprobadas en medio selectivo SD-Leu-Trp-His con las diluciones correspondientes. Se co-tranformaron los vectores pGBT9 y pGAD424 como controles de autoactivación del ensayo.

Para comprobar la especificidad de NINJA por otras proteínas de la familia TIFY se llevaron a cabo ensayos de dos híbridos en levaduras. Para ello, se clonaron las regiones codificantes de las proteínas PEAPOD1 (PPD1) (at4g14713), PEAPOD2 (PPD2) (at4g14720) y TIFY8 (at4g32570), en el vector pGBT9 (AD) y se co-tranformaron en la cepa PJ69-4A de *S. cerevisiae* con el plásmido PGAD24 (BD), que contiene la secuencia codificante de la proteína NINJA. Estos ensayos indicaron, que todas las proteínas de la familia ZIM testadas, interaccionaron de forma directa con NINJA (figura 24a).

De forma adicional se analizó si las proteínas de la familia AFP son capaces de interaccionar con las proteínas JAZs. Para ello se clonaron las regiones codificantes de AFP2 y AFP3 en el vector pGBT9, y JAZ1 en el vector pGAD24, y se analizó por doble híbrido su posible interacción. Se observó que ni AFP2 ni AFP3 interaccionaron con JAZ1 (figura 24b). Estos datos sugirieron una posible especificidad de las proteínas JAZs por NINJA.

vector pGBT9, y se co-transformaron en la cepa PJ69-4A de *S. cerevisiae*, con el plásmido PGAD24 que contiene la secuencia codificante de la proteína JAZ1. Los resultados muestran, que el dominio C de la proteína NINJA es necesario y suficiente para interactuar con JAZ1 (figura 26).

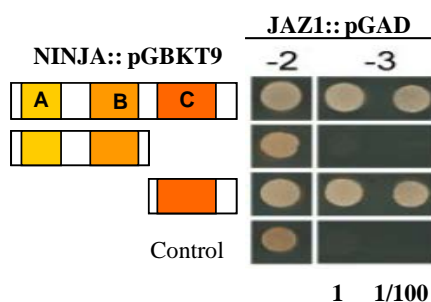


Figura 26. NINJA interactúa con las proteínas JAZ por el dominio C. Ensayos de dos híbridos en levadura en la cepa PJ69-4A de *S. cerevisiae* donde se co-transformaron los vectores pGBT9::NINJA así como distintos fragmentos especificados de dicha proteína (BD), con pGAD424::JAZ1 (AD). Las colonias transformantes fueron plaqueadas en medio mínimo SD-Leu-Trp como control de crecimiento de la levadura (-2) y las interacciones entre las proteínas usadas fueron comprobadas en medio selectivo SD-Leu-Trp-His con las diluciones correspondientes. Se co-transformaron los vectores pGBT9 y pGAD424 como controles de autoactivación del ensayo.

3.2.2.3. Caracterización fenotípica de las líneas de sobre-expresión de NINJA en respuesta a JA: inhibición del crecimiento de la raíz y medidas de antocianinas.

Para caracterizar fenotípicamente las líneas de *Arabidopsis* de sobre-expresión de NINJA, se llevaron a cabo ensayos de inhibición de crecimiento de la raíz y acumulación de antocianinas en respuesta a tratamientos de JA o COR. Para los ensayos de inhibición del crecimiento de la raíz, se crecieron en medio Johnson durante 9 días, plántulas de *Arabidopsis* de dos líneas de sobre-expresión de NINJA (OE1 y OE2), junto con el control Col-0. Se analizó la elongación de la raíz en ausencia o presencia de JA (10 μ M y 50 μ M) o COR (0,3 μ M y 1mM), y se observó que las líneas de sobre-expresión de NINJA presentaban una menor sensibilidad a cualquiera de las hormonas, en comparación con las plantas silvestres, como reflejó el menor acortamiento de su raíz (figura 27a, b). También se realizaron ensayos de acumulación de antocianinas en dos líneas de sobre-expresión de NINJA. Plántulas de 12 días de las líneas de sobre-expresión de NINJA tratadas con JA o COR presentaban menor acumulación de antocianinas que plántulas silvestres, aunque este contenido era superior al de mutantes *jin1* insensibles a la hormona (figura 27c).

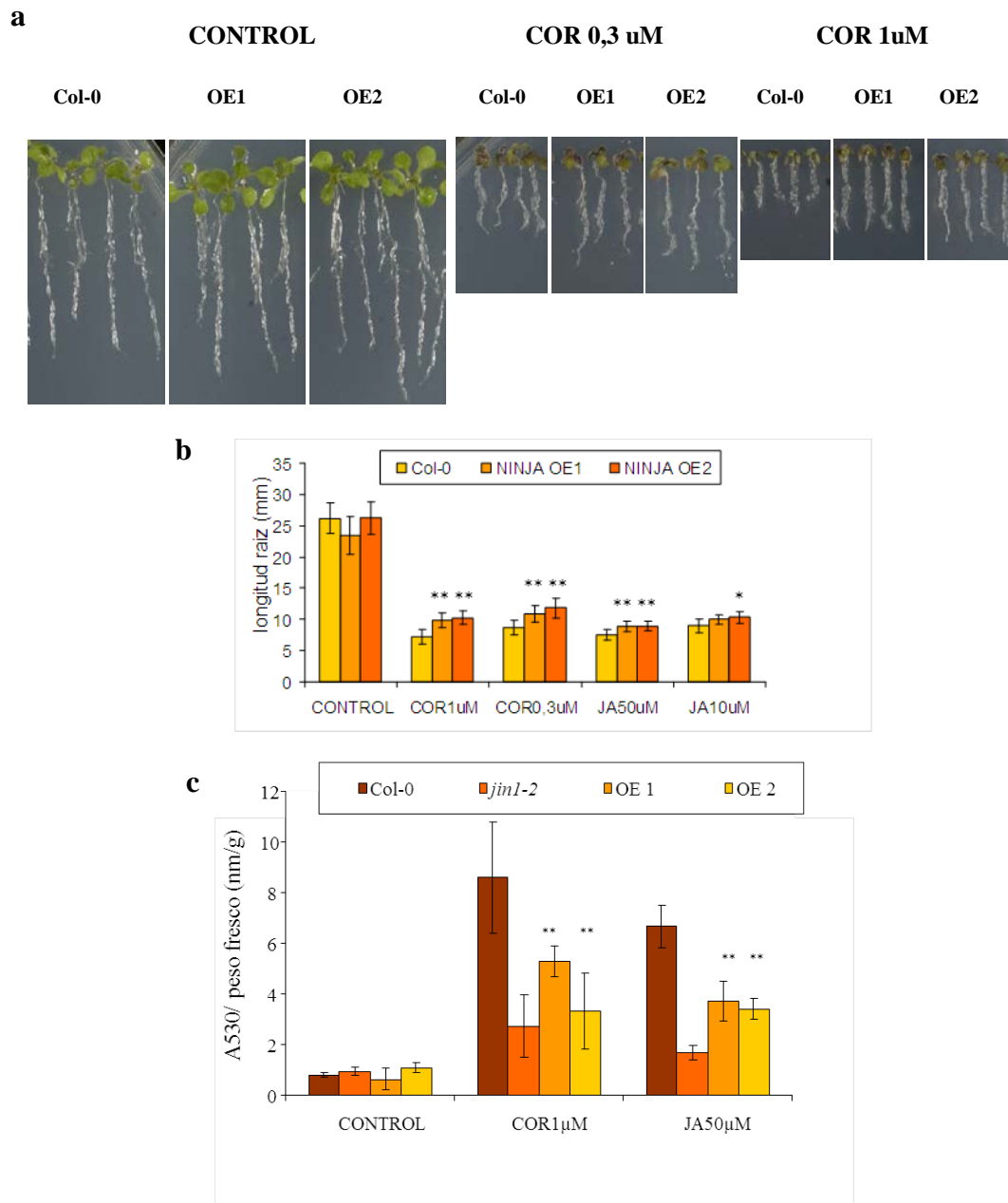


Figura 27. La sobre-expresión de NINJA genera insensibilidad al JA. a. Plántulas de *Arabidopsis* Col-0 y dos líneas de sobre-expresión de NINJA (OE1 y OE2) crecidas durante 9 días en medio Johnson control o en presencia de COR a las concentraciones indicadas. **b.** Análisis de la inhibición del crecimiento de la raíz en plántulas de *Arabidopsis* Col-0 y en dos líneas de sobre-expresión de NINJA (OE1 y OE2) crecidas en condiciones control y en presencia de JA o COR a las concentraciones indicadas. Los datos se representan en forma de media \pm d.s. n=20-25 y son el resultado de tres experimentos independientes. **c.** Análisis de la acumulación de antocianinas en plántulas de *Arabidopsis* Col-0, *jin1-2* y dos líneas de sobre-expresión de NINJA (OE1 y OE2) crecidas durante 12 días en medio Johnson control o en presencia de JA o COR a las concentraciones indicadas. Los datos se muestran como media media \pm d.s. n=10 y son el resultado de tres experimentos independientes. . Los asteriscos indican que las diferencias son estadísticamente significativas en comparación con Col-0 (test t de Student * $P \leq 0,01$, Student ** $P \leq 0,001$).

plantas transgénicas que sobre-expresan NINJA::GFP y la proteína JAZ3 marcada con ^{35}S . Se cuantificó la proteína residual JAZ3 [^{35}S] tras la incubación con extractos silvestres o con extractos de plantas que sobre-expresan NINJA, tratados con JA. Se observó que, en ambos tipos de extractos, el tratamiento con JA provocó una degradación de la proteína JAZ3 marcada, de tal forma que a las 4 horas de tratamiento sólo quedaba en el medio menos del 10 por ciento de la proteína JAZ3 inicial (figura 28). Además, en ausencia de la hormona (control) o en presencia del inhibidor del proteasoma MG132, la integridad de la proteína JAZ3 no se ve afectada (figura 28). Estos resultados indican, que NINJA no protege a las proteínas JAZ de la degradación en presencia de la hormona.

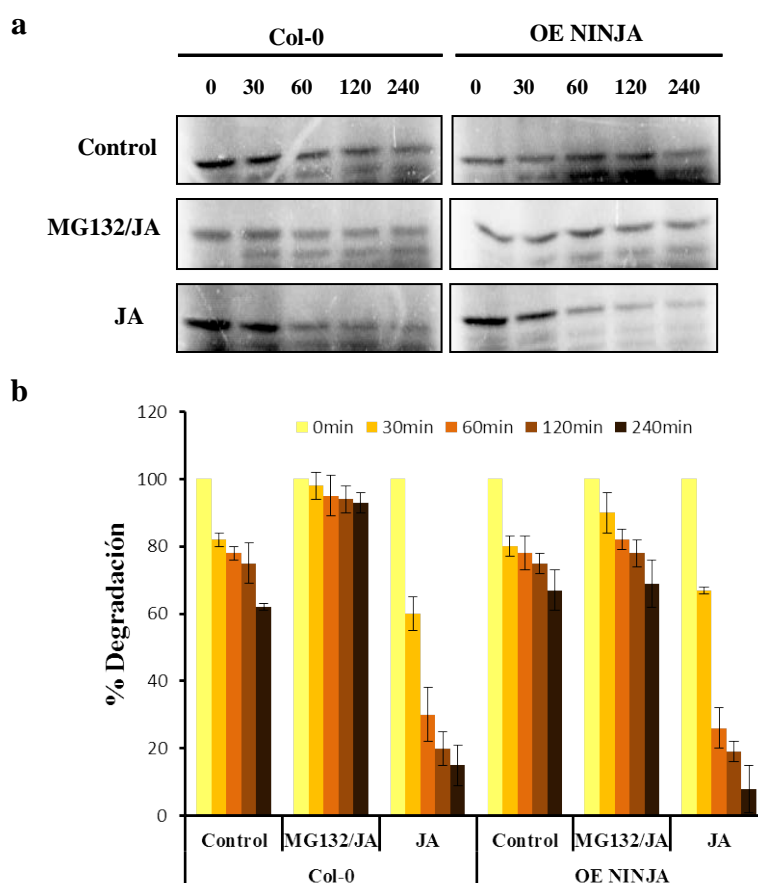


Figura 28. La sobre-expresión de NINJA no afecta a la estabilidad de las proteínas JAZ. **a.** Gel SDS-PAGE donde se observa la degradación gradual de la proteína marcada radiactivamente [^{35}S]JAZ3 después de la incubación con extractos celulares procedentes de plántulas de *Arabidopsis* Col-0 silvestres o plántulas transgénicas que sobre-expresan NINJA, y que han sido tratadas con 50 mM JA y +/- 200 mM MG132, un inhibidor específico del proteasoma. **b.** Gráfica donde se muestra la cuantificación de la proteína [^{35}S]JAZ3 tras la incubación con extractos de plántulas de *Arabidopsis* silvestres Col-0 o plántulas transgénicas que sobre-expresan NINJA, a diferentes tiempos con los tratamientos indicados. Este experimento fue realizado por triplicado ($n=3 \pm \text{d.s}$)

3.2.2.4. Caracterización fenotípica de las líneas de pérdida de función de NINJA en respuesta a JA

No existen líneas de pérdida de función de inserción de ADN-T para NINJA en los bancos de semillas de *Arabidopsis*, lo que sugiere que la pérdida de función de esta proteína podría ser letal. Por tanto, en el laboratorio del Dr. Goossens se generaron líneas transgénicas de *Arabidopsis* de ARN interferente (ARNi) para NINJA, que mostraban una reducción muy significativa en sus niveles de expresión (figura 29). Estas líneas se utilizaron en nuestro laboratorio para los análisis fenotípicos que se describen a continuación.

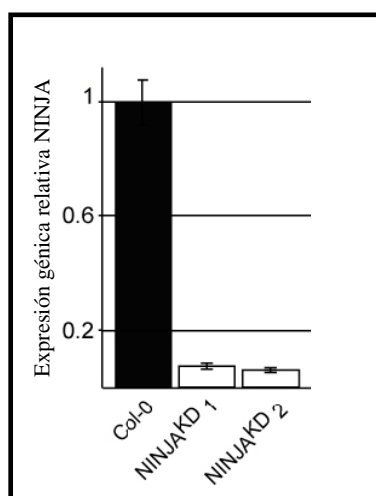


Figura 29. Niveles de expresión de NINJA en las líneas transgénicas de ARNi. Cuantificación por PCR cuantitativa en tiempo real de la expresión de NINJA en dos líneas de *Arabidopsis* transgénicas de ARNi de NINJA en comparación con plántulas silvestres Col-0.

3.2.2.4.1. Inhibición del crecimiento de la raíz y acumulación de antocianinas mediada por JA en las líneas ARNi de NINJA

Los ensayos de inhibición del crecimiento de la raíz, confirmaron un aumento en la sensibilidad a JA (10uM y 50uM) o COR (0,3 uM y 1 uM) en las raíces de plántulas de las líneas de pérdida de función de NINJA en comparación con plantas Col-0 silvestres (figura 30b), que se observó por un acortamiento significativo en la longitud de la raíz en las plantas tratadas con hormona (figura 30a).

También se llevaron a cabo experimentos de medida de acumulación de antocianinas en respuesta a JA o COR. Como se observa en la figura 30c, ninguno de los tratamientos afecta diferencialmente al nivel de acumulación de antocianinas en estas líneas respecto de plantas control.

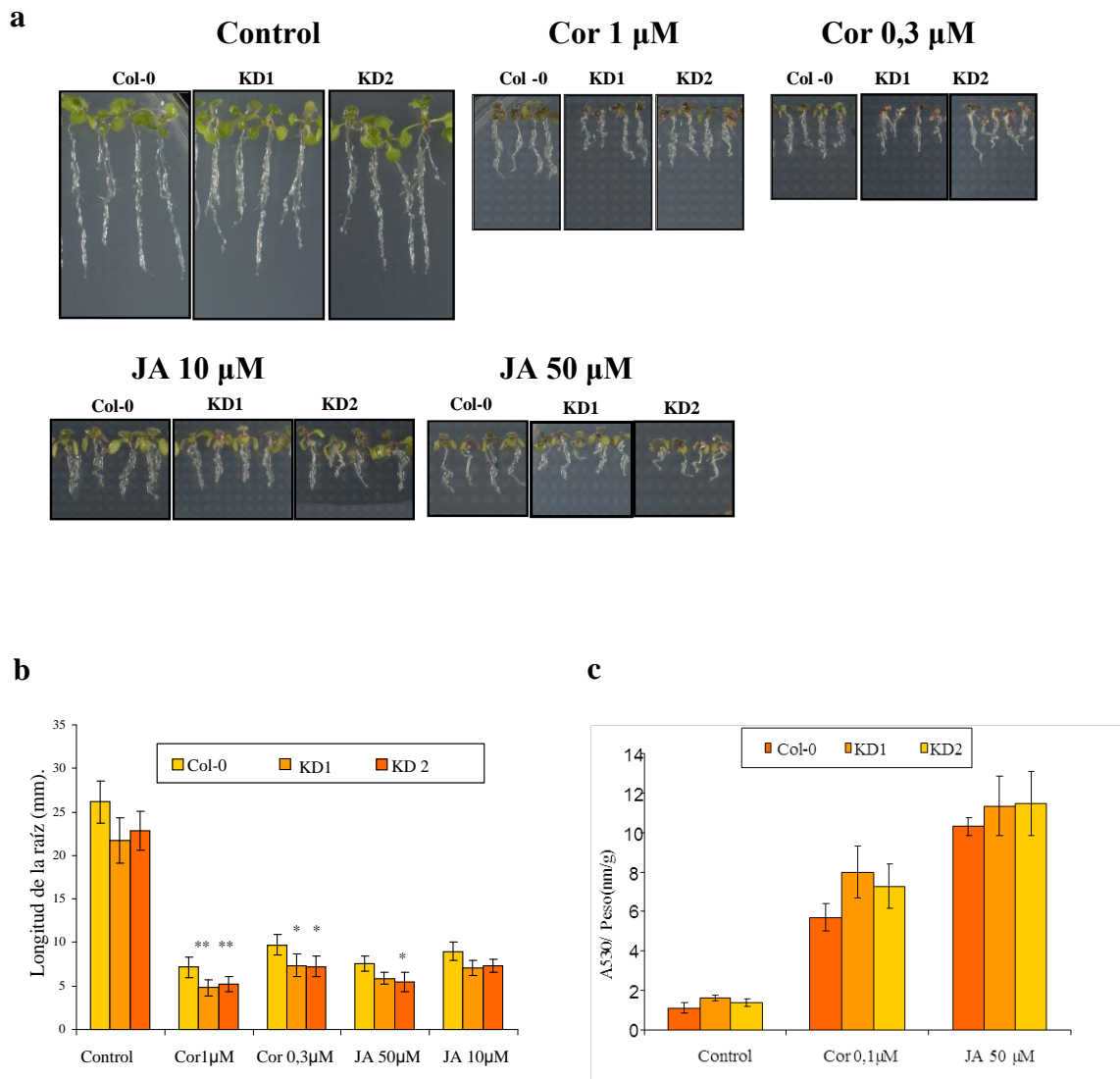


Figura 30. Las líneas de disminución de función de *NINJA* son hipersensibles a JA. **a.** Plántulas de *Arabidopsis* Col-0 y dos líneas de reducción de función de *NINJA* (KD1 y KD2) crecidas durante 9 días en medio Johnson control o en presencia de JA o COR a las concentraciones indicadas. **b.** Análisis de la inhibición del crecimiento de la raíz en las plántulas anteriormente indicadas y en las mismas condiciones. Los datos se representan en forma de media \pm d.s. n=20-25 y son el resultado de tres experimentos independientes. **c.** Análisis de la acumulación de antocianinas en plántulas de *Arabidopsis* Col-0 y dos líneas de pérdida de función de *NINJA* (KD1 y KD2) crecidas durante 12 días en medio Johnson control o en presencia de JA o COR a las concentraciones indicadas. Los datos se muestran como media \pm d.s. n=10 y son el resultado de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la significancia estadística en comparación con Col-0 (test t de Student * $P \leq 0,01$, Student ** $P \leq 0,001$).

3.2.2.4.2. Análisis transcriptómico de las líneas de pérdida de función de NINJA

Para estudiar el papel de *NINJA* en la regulación de la expresión génica mediada por JA se realizó un análisis transcriptómico mediante *microarrays* de *Arabidopsis* (Agilent). Se realizó una comparación de la expresión génica entre plántulas de *Arabidopsis* de reducción de función de NINJA y plántulas silvestres Col-0, en condiciones basales y en respuesta a tratamientos de 3 horas con COR. A partir del análisis de tres réplicas biológicas se obtuvieron los ratios de expresión relativa para cada uno de los genes representados en el *microarray*, así como los valores de probabilidad asociados a cada valor de expresión génica. Se consideraron genes con expresión significativamente aumentada en la línea ARNi *NINJA* con respecto a Col-0, aquellos genes con un ratio de intensidad (*FoldChange*) superior a 1,5 y un valor de probabilidad ajustada (FDR) inferior a 0,05. De forma análoga, la expresión génica significativamente disminuida en la línea ARNi *NINJA* con respecto a Col-0 fue considerada para valores de intensidad génica inferiores a -1,5 y una probabilidad menor a 0,05. Estos análisis revelaron que, incluso sin tratamiento exógeno con la hormona, las líneas de pérdida de función de *NINJA*, tienen sobre-expresados numerosos genes de respuesta temprana a JA en comparación con Col-0 (figura 31).

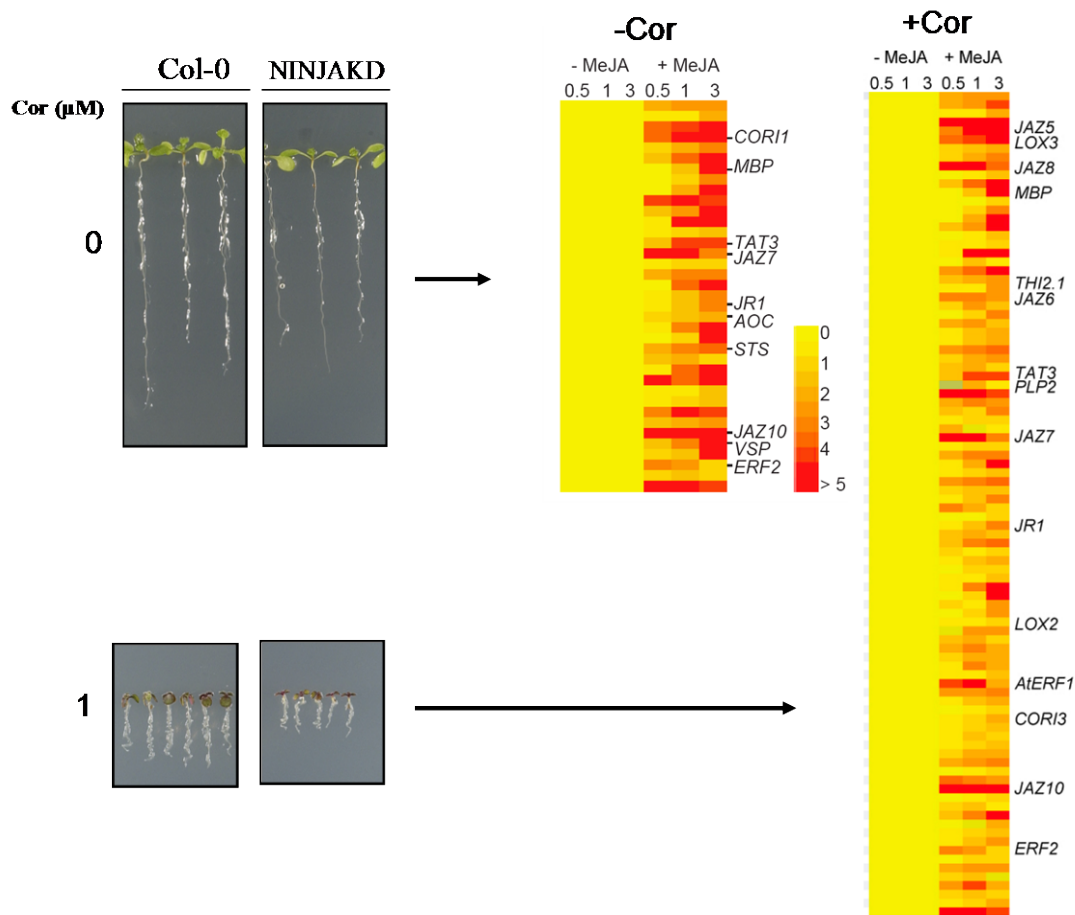


Figura 31. Las líneas de reducción de función de *NINJA* son hipersensibles a JA. Representación de los genes diferencialmente expresados en la línea ARNi *NINJA* que se encuentran sobre-expresados en plantas tratadas con MeJA en condiciones control (apéndice tabla suplenetaria 2) y tratadas 3 horas con COR (apéndice tabla suplementaria 3). También se representa plántulas de *Arabidopsis* Col-0 y de ARNi *NINJA* crecidas en condiciones control y o en COR 1μM.

Tomados en conjunto, los resultados del análisis fenotípico y transcriptómico de las líneas de sobre-expresión o reducción de función de *NINJA* apoyan la hipótesis de que *NINJA* se comporta como un regulador negativo de la vía de señalización de JA.

3.2.2.5. Búsqueda de nuevos interactores de *NINJA*: TPL

Para profundizar en el conocimiento de la función que desempeña *NINJA* en la señalización del JA, nuestros colaboradores en el VIB realizaron un nuevo experimento de TAP-tagging usando *NINJA* como cebo. *NINJA* formó complejos con distintas proteínas entre las que se encuentran el co-represor TPL y sus homólogos TPR2 y TPR3. Estos complejos se formaron independientemente de la presencia o no en el

medio de JA. NINJA también fue capaz de formar complejos proteicos con MYC3, un FT cercano filogenéticamente a MYC2, y con algunas proteínas del grupo II de la familia TIFY, como JAZ12 y PPD2, lo que confirmó los resultados previos de TAP-tagging (Tabla 4 y 3).

35S-NINJA-CmTAP	
ATG	Nombre proteína
AT5G27030	TPR3
AT1G15750	TOPLLESS
AT3G16830	TPR2
AT4G14720	PPD2
AT5G46760	MYC3
AT5G20900	JAZ12

Tabla 4. Tabla de interactores de NINJA obtenidos mediante técnicas de TAP-tagging.

Se ha descrito que el co-represor TPL interacciona de forma directa con el motivo EAR (*Ethylene-responsive element binding factor-associated Amphiphilic Repression*) de la proteína IAA12. Además, dicho motivo participa en la represión transcripcional y se encuentra presente en la mayoría de las proteínas AUX/IAA (Szemenyei y col., 2008). Basándonos en estos resultados, se analizó la secuencia aminoacídica de la proteína NINJA mediante alineamiento con las secuencias de las proteínas AUX/IAA, y se identificó un motivo EAR en el dominio A de NINJA (figura 32). Esto sugiere que podría darse una posible interacción directa entre TPL y NINJA mediada por el motivo EAR, de igual forma que TPL interacciona con las proteínas AUX/IAA mediante dicho dominio. Para confirmar esta hipótesis se realizaron ensayos de dos híbridos en levaduras y PD.

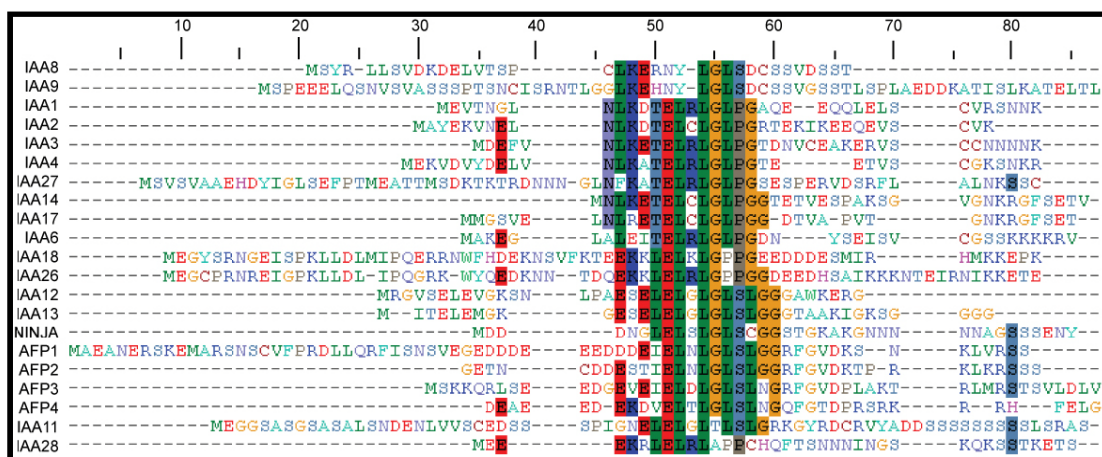


Figura32. Localización del dominio EAR en las proteínas NINJA, AUX/IAA y AFP. Alineamiento de la secuencia proteica de la región amino terminal de 16 proteínas AUX/IAA caracterizadas por interactuar con TPL, NINJA y cuatro proteínas AFP. Se representa la región proteica comprendida entre los aminoácidos 1-37, excepto para IAA9, IAA11, IAA18, IAA26, IAA27 y AFP1 que se representa la región comprendida entre los aminoácidos 1-70, AFP2 entre los aminoácidos 47-85 y AFP4 entre el 54-90.

Se realizaron ensayos de PD entre la proteína NINJA fusionada a MBP en su extremo amino terminal y extractos de plantas transgénicas que sobre-expresan la proteína TPL fusionada al epítipo HA. En este experimento se observó que la proteína MBP::NINJA es capaz de formar complejo con TPL y que esta interacción no se debe a una interacción inespecífica debido a la proteína MBP (figura 33ab).

Este resultado fue confirmado por ensayos de dos híbridos en levadura realizados en el laboratorio del Dr. Goossens. Estos ensayos demostraron una interacción directa entre ambas proteínas completas (figura 33b). Además, utilizando fragmentos de los tres dominios conservados de NINJA se confirmó que TPL interactúa con el dominio A, que contiene el motivo EAR. Al mutarse dicho motivo la interacción entre ambas proteínas ya no tiene lugar (figura 31b). Como se observa en la figura 26 la delección del motivo EAR de NINJA no afecta en la interacción con la proteína JAZ1.

Estos resultados son consistentes con los de los ensayos de TAP-tagging usando la proteína JAZ5 como cebo, que se describen en la Tabla 4. Esos resultados confirmaron que JAZ5 es capaz de formar complejos con el co-represor TPL y otros dos miembros de esta familia de co-represores, TPR2 Y TPR3, en planta.

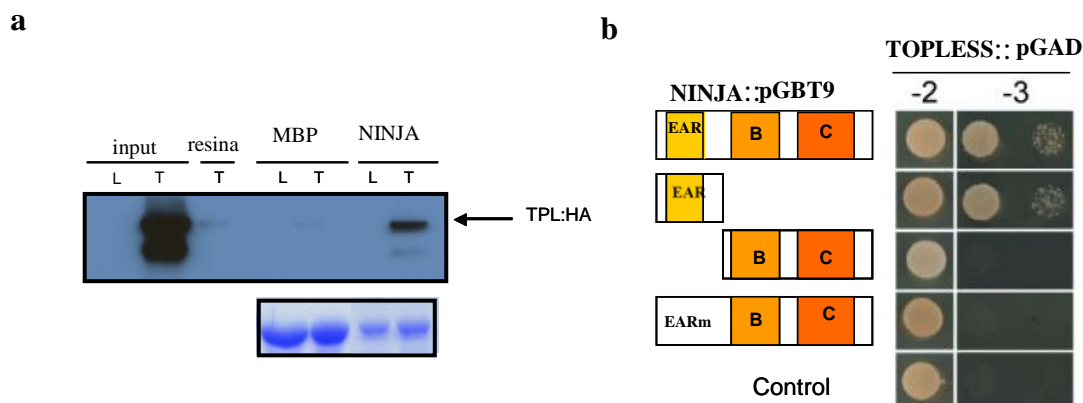


Figura 33. NINJA interacciona con TPL por su dominio EAR. a. Membrana de WB revelada con anticuerpo anti-HA donde se observa la proteína TPL::HA recuperada después de ensayos de PD donde se usaron plantas transgénicas que sobre-expresan TPL::HA (T) o Ler (L) y proteínas recombinantes MBP o NINJA fusionada a MBP. En la línea inferior se muestran geles teñidos con Coomassie donde se observa la cantidad de proteína recombinante usada. **b.** Ensayo de doble híbrido en levadura donde se co-transformaron los vectores pGBT9 (DU) and pGAD424 (DA) en los que se clonaron las secuencias codificantes de las proteínas NINJA y TPL respectivamente, así como distintos fragmentos de la proteína NINJA. Las colonias transformantes fueron sembradas en medio mínimo SD-Leu-Trp (-2) y en medio selectivo SD-Leu-Trp-His (-3) con las diluciones indicadas. Se co-transformaron los vectores pGBT9 y pGAD424 como controles de autoactivación del ensayo.

3.2.2.5.1. Caracterización fenotípica del mutante *tpl-1*

La asociación de TPL con las proteínas JAZs a través de NINJA y su implicación en la regulación de la ruta del JA fue confirmada mediante el análisis fenotípico del mutante *tpl-1*. Se llevaron a cabo ensayos de inhibición del crecimiento de la raíz y de acumulación de antocianinas en respuesta a tratamientos con JA (10 μ M y 50 μ M) o COR (0,3 μ M y 1 μ M). Para ello se crecieron plántulas de *Arabidopsis* del mutante *tpl-1* junto con el control Ler en medio Johnson durante 9 días, en ausencia o presencia de JA (10 μ M y 50 μ M) o COR (0,3 μ M y 1mM). El mutante *tpl-1* presentaba una mayor sensibilidad al JA o a la COR, en comparación con las plantas silvestres Ler, como se refleja en el mayor acortamiento de su raíz en respuesta a cada una de las hormonas (figura 34a, b). La medida de antocianinas, sin embargo, no mostró cambios significativos.

Estos resultados sugieren que las proteínas JAZs ejercen su función de represión transcripcional de los genes inducibles por JA mediante su asociación con el co-represor TPL, a través de NINJA.

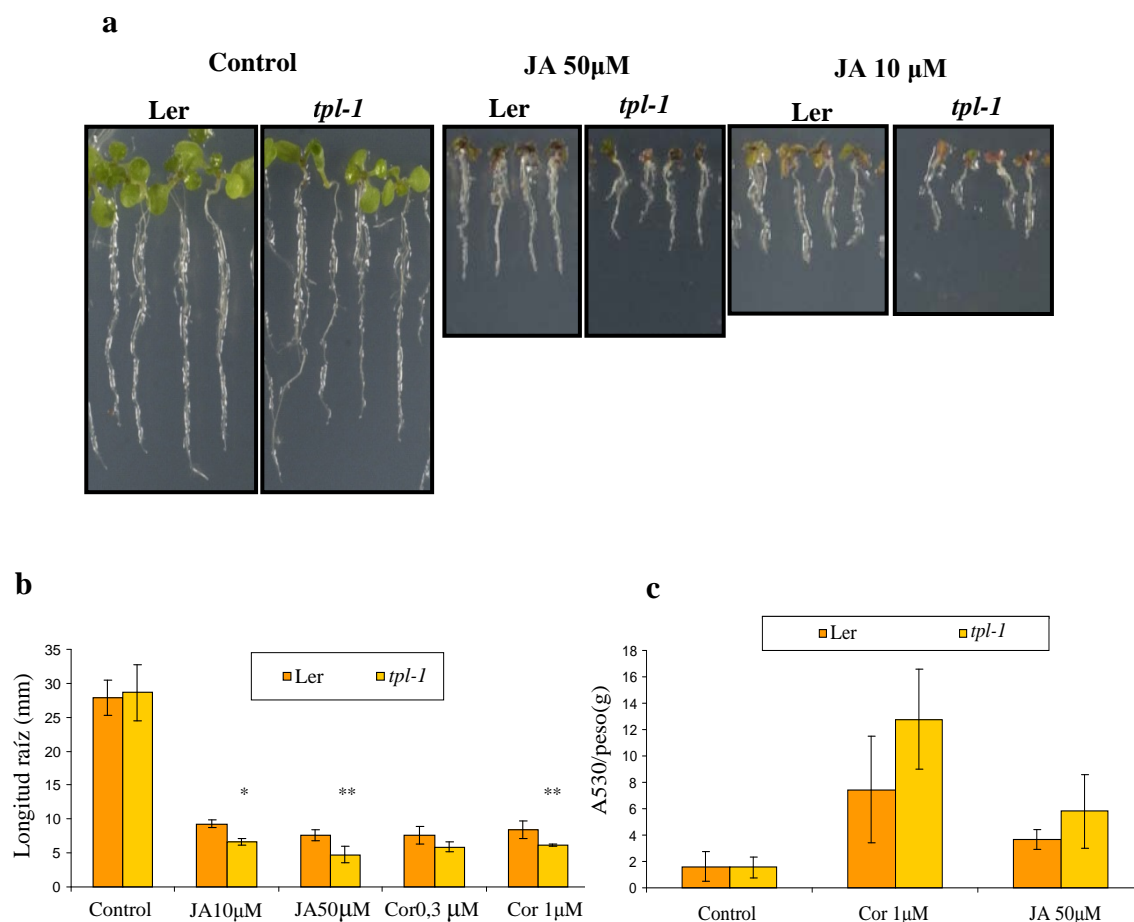


Figura 34. El mutante *tpl-1* es hipersensible a JA **a.** Plántulas de *Arabidopsis* Col-0 y *tpl-1* crecidas durante 9 días en medio Johnson control o en presencia JA a las concentraciones indicadas. **b.** Análisis de la inhibición del crecimiento de la raíz en las plántulas anteriormente indicadas, crecidas en medio Johnson control o en presencia de JA (10 μM y 50 μM) o COR (0,3 μM y 1 μM). Los datos se representan en forma de media±d.s. n=20-25 y son el resultado de tres experimentos independientes. **c.** Análisis de la acumulación de antocianinas en plántulas de *Arabidopsis* Col-0 y el mutante *tpl-1* durante 12 días en medio Johnson control o en presencia de JA o COR a las concentraciones indicadas. Los datos se muestran como media media±d.s. n=10 y son el resultado de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la significancia estadística en comparación con Col-0 (test t de Student * $P \leq 0,01$, Student ** $P \leq 0,001$).

3.2.2.6. Caracterización de NINJA como represor transcripcional

Considerando la asociación de NINJA con TPL, se analizó la posible capacidad transcripcional represora de la proteína NINJA. Para ello, se realizaron experimentos de expresión transitoria en protoplastos llevados a cabo en el laboratorio del Dr. A. Goossens, que confirmaron que NINJA se comporta como un co-represor transcripcional. En estos experimentos, la co-expresión de NINJA con el FT MYC2 redujo de forma significativa la capacidad transcripcional del FT (figura 35b). Además, el dominio que contiene el motivo EAR es suficiente para mantener la represión de la expresión del gen reportero (Figura 35a).

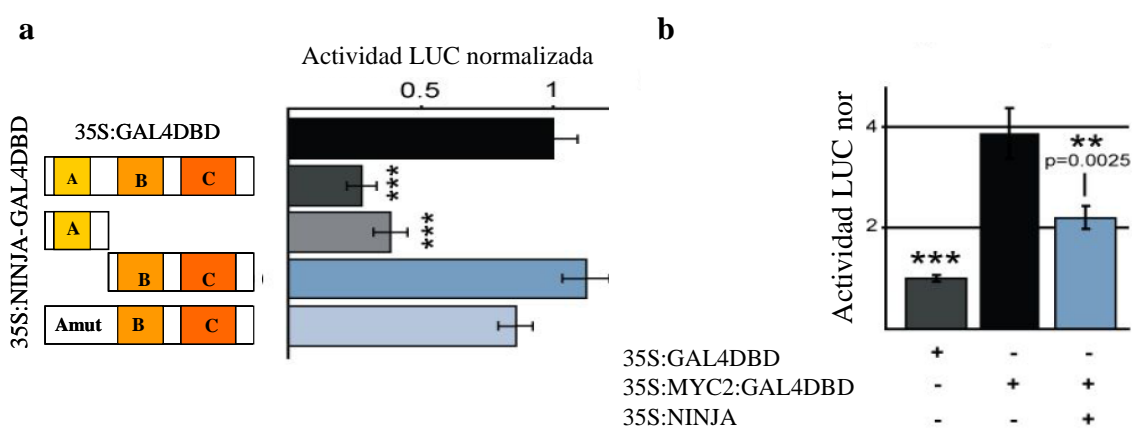


Figura 35. NINJA actúa como un represor transcripcional en la vía de señalización del JA.

Actividad de transactivación en protoplastos de tabaco transfectedos con el vector que contiene el gen reportero PUAS-fLUC, las construcciones que poseen las secuencias diana específicas fusionadas o no al dominio GAL4DBD y el vector de normalización P35SrLUC. Los datos se muestran como la media±d.s. relativos a valor de referencia (barra negra), n=8 (dos asteriscos, $P \leq 0.01$, tres asteriscos, $P \leq 0.001$). **a.** Medida de la represión de la actividad transcripcional de un gen reportero cuando se co-transfectan los protoplastos con distintos fragmentos de NINJA **b.** represión de la actividad transcripcional del FT de MYC2 por NINJA. Los asteriscos indican la significancia estadística en comparación el control (test t de Student ** $P \leq 0,01$, Student *** $P \leq 0,001$).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que las proteínas NINJA y TPL se comportan como co-represores transcripcionales de la vía de señalización de JA en *Arabidopsis*. Además, son consistentes con un modelo en el que TPL es un co-represor general de la transcripción en plantas, que es reclutado a promotores específicos por las proteínas JAZs mediante la proteína adaptadora NINJA.

3.3. Modelos de co-represión alternativos al tandem NINJA-TPL-JAZ

3.3.1. Motivo de represión EAR en la familia de proteínas JAZs

Se realizó un análisis de las secuencias de las proteínas de la familia JAZ usando el algoritmo *ClustalW*, y se observó la presencia del motivo EAR en cuatro de ellas. Esto ha sido confirmado posteriormente por Kagale y col., 2010 (tabla 5).

ATG	Proteína	Motivo EAR	
		Secuencia	Loc
AT1G17380	JAZ5	DLNEPT	156
		LDLRL	272
AT1G72450	JAZ6	DLNEPT	162
		LELKL	267
AT1G30135	JAZ7	LELKL	10
AT2G34600	JAZ8	LELKL	28

Tabla 5. Motivos EAR de las proteínas JAZ. Tabla donde se detalla la localización (Loc) y tipo de dominio EAR que poseen algunas proteínas de la familia JAZ.

Las proteínas JAZ7 y JAZ8 poseen un dominio EAR en su extremo amino terminal del tipo LXLXL (tabla 7). Las proteínas JAZ5 y JAZ6 poseen dos dominios de represión EAR, uno en el extremo carboxilo terminal de tipo LXLXL y otro en la parte central de la proteína de tipo DLNEP (figura 36 y tabla 5).

La existencia de estos dominios EAR en proteínas JAZs sugiere que la maquinaria represora de la vía de señalización del JA podría tener distintas alternativas al modelo de represión general formado por el complejo proteico JAZ-NINJA-TPL, en las cuales TPL ejerciera su función represora interaccionando directamente con el motivo EAR de estas proteínas JAZs, en lugar de hacerlo a través de la proteína adaptadora NINJA.

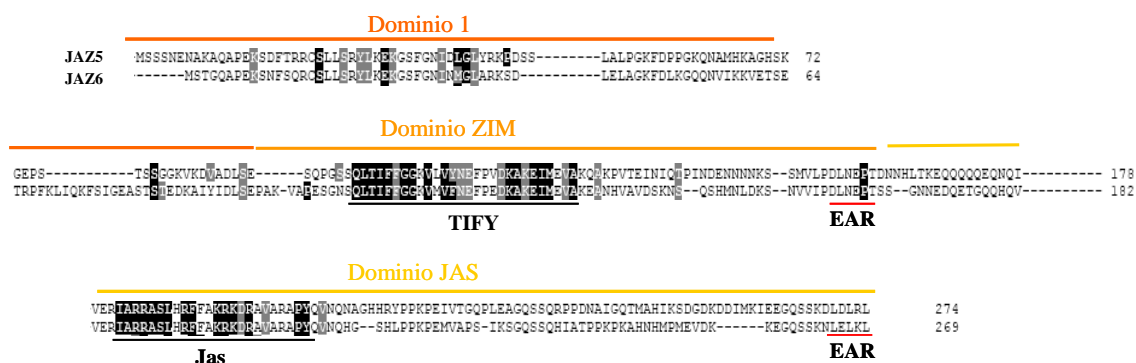


Figura 36. Representación esquemática de la secuencia proteica de las proteínas JAZ5 y JAZ6. Representación de los dominios estructurales 1, ZIM y JAS de las proteínas JAZ5 y JAZ6. En rojo se señalan los motivos EAR de ambas proteínas.

3.3.2. JAZ5 y JAZ6 son dianas directas de TPL

Los ensayos de TAP-tagging descritos anteriormente, demostraron que la proteína JAZ5 es capaz de formar complejos proteicos con el co-represor TPL y con otros dos miembros de esta familia, TPR2 y TPR3 (tabla 6), aunque estos resultados no demuestran que la interacción sea directa. Para investigar la hipótesis de una posible interacción directa entre algunos miembros de la familia JAZ y el co-represor TPL, se llevaron a cabo ensayos de dos híbridos en levaduras y experimentos de PD.

Para los ensayos de dos híbridos, se clonaron las regiones codificantes de las proteínas de la familia JAZ en el vector pGBKT7 (AD) y se co-transformaron en la cepa ΔH109 de *S. cerevisiae* con el plásmido pGADT7 que contiene la secuencia codificante de la proteína TPL. Estos ensayos demostraron que sólo las proteínas JAZ5 y JAZ6 son capaces de interactuar de una forma directa con el co-represor TPL (figura 37a).

Estos experimentos también se realizaron en el sentido contrario, es decir, clonando las regiones codificantes de las proteínas de la familia JAZ en el vector pGADT7 (AD) y la secuencia codificante de la proteína TPL en el vector pGBKT7 (BD). En este sentido, no sólo las proteínas JAZ5 y JAZ6 interactuaron con el co-represor, sino que, de una forma más débil, también se observó interacción con otros miembros de la familia JAZ (JAZ1, JAZ2 y JAZ7) (figura 37b).

Además, se realizaron experimentos de PD con las proteínas JAZs fusionadas a la proteína de unión a la maltosa (MBP::JAZ) y extractos de plantas transgénicas que

sobre-expresan la proteína TPL fusionada al epítipo HA. Dichos ensayos confirmaron los resultados obtenidos en los ensayos de dos híbridos en levadura. Las proteínas JAZ5 y JAZ6 fusionadas a MBP, son capaces de formar complejos proteicos con el co-represor TPL, interaccionando de forma muy fuerte. También se observó una interacción débil entre el co-represor y las proteínas JAZ1, JAZ2 y JAZ9 (figura 37c).

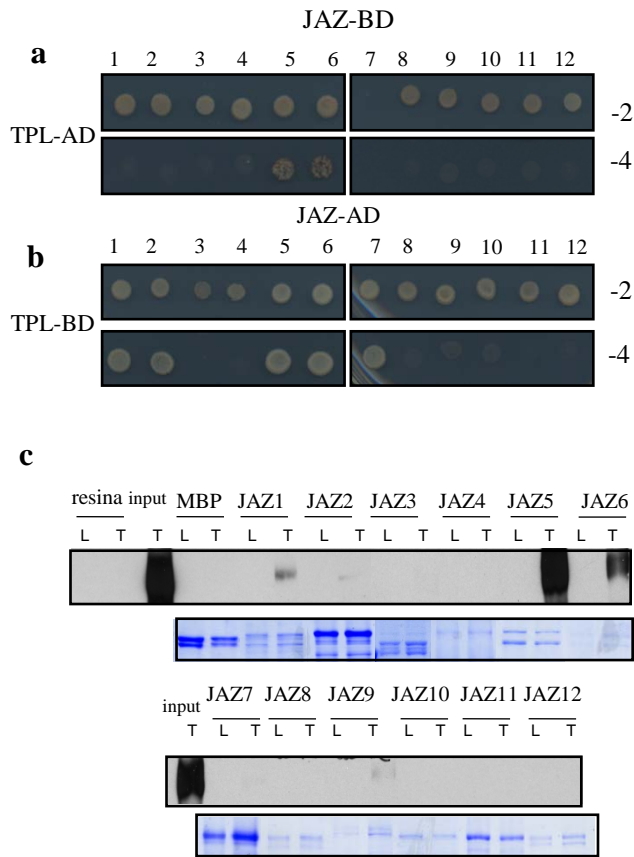


Figura 37. Interacción de TPL con proteínas JAZ. a,b. Ensayo de dos híbrido en la cepa AH109 de *S. cerevisiae* donde se co-transformaron los plásmidos pGADT7 (AD) y pGBKT7 (BD) que expresan las proteínas indicadas en cada caso. Los transformantes fueron sembrados en medio mínimo SD-Leu-Trp como control de crecimiento (-2). Para confirmar las posibles interacciones entre las proteínas usadas, las levaduras co-transformadas fueron sembradas en medio selectivo SD-Leu-Trp-His-Ade (-4). **b.** Membranas de WB reveladas con anticuerpo anti-HA donde se observa la proteína TPL::HA recuperada después de ensayos de PD donde se usaron plantas transgénicas que sobre-expresan TPL::HA (T) o WT (Ler, L) y proteínas recombinantes MBP o MBP::JAZ. En la línea inferior se muestran geles teñidos con Coomassie donde se observa la cantidad de proteína

3.3.2.1. Dominio de interacción de JAZ5 y JAZ6 con el represor TPL : dominio EAR

Para mapear la región específica de interacción de las proteínas JAZ5 y JAZ6 con TPL, se llevaron a cabo ensayos de dos híbridos en levadura con distintas variantes delecionadas de las proteínas JAZ5 y JAZ6. Se generaron tres fragmentos que se denominaron dominio 1, dominio ZIM y dominio JAS (figura 33). El dominio ZIM contiene el motivo EAR del tipo DLNEP, y el dominio JAS contiene en su extremo carboxilo terminal el motivo EAR del tipo LXLXL. Dichos fragmentos se clonaron en el vector pGBKT7 (BD) y se co-transformaron en la cepa de levaduras *S. cerevisiae*, con el vector pGAD (AD) donde se clonó la secuencia codificante de TPL. Los resultados demostraron que TPL solamente fue capaz de interaccionar con el fragmento de JAZ5 o JAZ6 que contiene el motivo EAR del tipo DLNEP (figura 38a).

Además, estos resultados se confirmaron mediante ensayos de PD. Para ello, se fusionaron las proteínas JAZ5 y JAZ6, así como los dominios 1, ZIM y Jas de dichas proteínas, a la MBP en el extremo amino terminal y se incubaron con extractos de plantas transgénicas que sobre-expresan la proteína TPL fusionada al epítipo HA. En dichos ensayos se observó, que únicamente las proteínas completas JAZ5 y JAZ6 fusionadas a MBP, así como el fragmento ZIM que contiene el motivo EAR del tipo DLNEP de cada una de ellas, son capaces de interaccionar con el co-represor TPL (figura 38b).

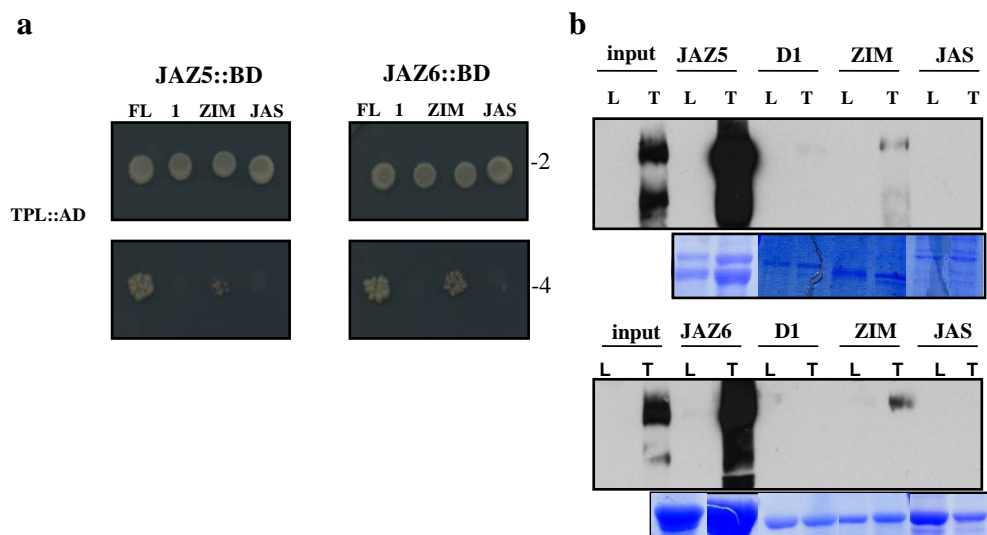


Figura 38. Interacción de TPL con el dominio ZIM de JAZ5 y JAZ6. a,b. Ensayo de doble híbrido donde se co-transformaron los plásmidos pGADT7 y pGBKT7 que expresan las proteínas indicadas en cada caso. Los transformantes fueron sembrados en medio mínimo SD-Leu-Trp como control de crecimiento (-2) o en medio selectivo SD-Leu-Trp-His-Ade (-4). **b.** Membranas de WB reveladas con anticuerpo anti-HA donde se observa la proteína TPL::HA recuperada después de ensayos de PD donde se usaron plantas transgénicas que sobre-expresan TPL::HA (T) o WT (Ler; L) y las proteínas recombinantes MBP, JAZ5, JAZ6 y sus correspondientes fragmentos fusionadas a MBP. En la línea inferior se muestran geles teñidos con Coomassie donde se observa la cantidad de proteína recombinante usada.

Para confirmar la hipótesis de que la interacción entre TPL y las proteínas JAZs se da a través del dominio EAR del tipo DLNEP, se generaron construcciones del fragmento ZIM de las proteínas JAZ5 y JAZ6 en las que fueron mutados por Alaninas los residuos del dominio EAR implicados en la represión, (DLNEP→AANEA). Ambas construcciones fueron clonadas en los vectores pGADT7 y pGBKT7 y co-transformadas respectivamente en la cepa ΔH109 de *S. cerevisiae* con la construcción apropiada de TPL.

Los resultados de los experimentos en levadura demostraron, independientemente de la dirección en la que se encuentren clonados los fragmentos, que cuando el motivo EAR de tipo DLNEP se encuentra mutado, TPL no es capaz de seguir manteniendo la interacción con el fragmento ZIM (figura 39a).

Estos resultados en levadura se confirmaron con ensayos de PD. Para ello, se clonaron en el vector pTH1 las secuencias codificantes completas de JAZ5 y JAZ6, los dominios 1, ZIM y JAS de dichas proteínas y el dominio ZIM de ambas proteínas con el motivo EAR mutado, se expresaron en la cepa BL21 de *E. coli* y se purificaron. Dichas proteínas llevan el epítipo MBP fusionado a su dominio amino terminal. Posteriormente se incubaron con extractos de plantas transgénicas que sobre-expresan la proteína TPL fusionada al epítipo HA. En dichos ensayos se observó, que únicamente las proteínas completas, así como el fragmento ZIM que contiene el motivo EAR del tipo DLNEP, son capaces de interactuar con el co-represor TPL (figura 39b). Ninguno de los fragmentos ZIM de las proteínas JAZ5 y JAZ6 que contienen el motivo EAR mutado fueron capaces de interactuar con dicho co-represor (figura 39b). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el motivo EAR del tipo DLNEP es el responsable de la interacción directa con el co-represor TPL.

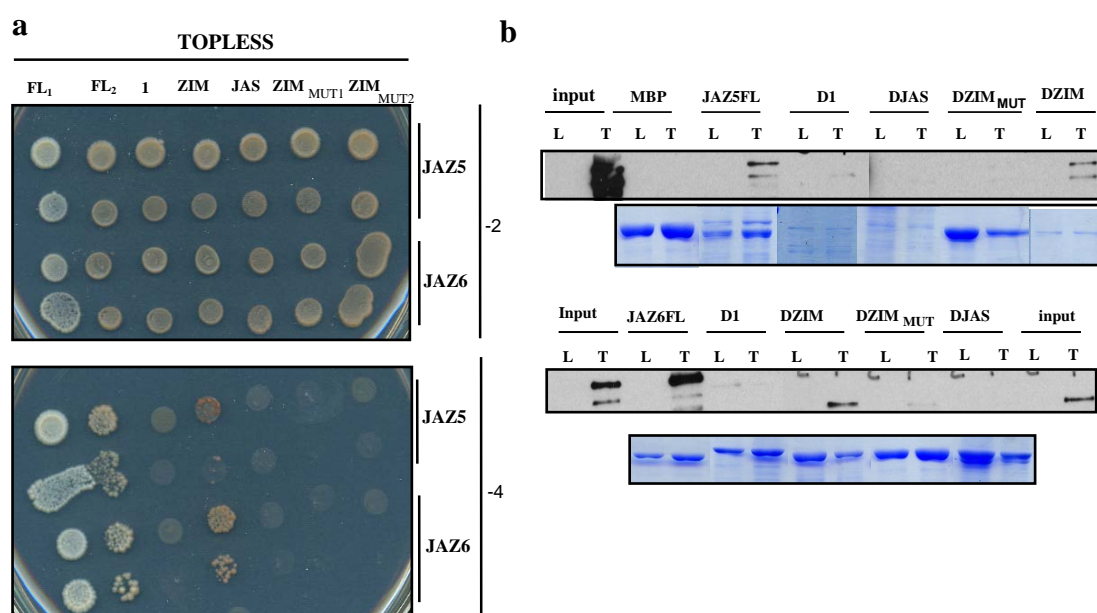


Figura 39. Interacción de TPL con uno de los motivos EAR de JAZ5 y JAZ6. a,b. Ensayo de doble híbrido donde se co-transformaron los plásmidos pGADT7 (TPL, JAZ5FL₁, JAZ5.1, JAZ5.ZIM, JAZ5.JAS, JAZ5.ZIM_{MUT1}, JAZ6FL₁, JAZ6.1, JAZ6.ZIM, JAZ6.JAS, JAZ6.ZIM_{MUT1}) y pGBKT7 (TPL, JAZ5FL₂, JAZ5.ZIM_{MUT2}, JAZ6FL₂, JAZ6.ZIM_{MUT2}). Los transformantes fueron sembrados en medio mínimo SD-Leu-Trp como control de crecimiento (-2) o en medio selectivo SD-Leu-Trp-His-Ade (-4) para comprobar las interacciones. **b.** Membranas WB reveladas con anticuerpo anti-HA donde se observa la proteína TPL-HA recuperada después de ensayos de PD donde se usaron plantas transgénicas que sobre-expresan TPL::HA (T) o WT (Ler; L) y las proteínas recombinantes MBP, JAZ5, JAZ6 y sus correspondientes fragmentos fusionados a MBP. En la línea inferior se muestran geles teñidos con Coomassie donde se observa la cantidad de proteína recombinante usada.

Los mismos experimentos de PD y dos híbridos en levaduras con la proteína JAZ6 completa con el motivo EAR mutado confirmaron que el dominio EAR DLNEP es necesario y suficiente para la interacción con TPL, incluso en el contexto de la proteína completa (figura 40).

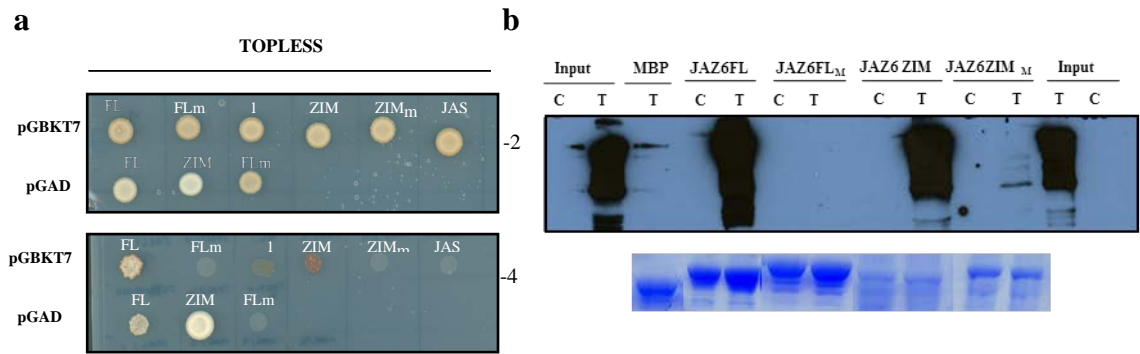


Figura40. Interacción de TPL con el motivo EAR de la proteína JAZ6. **a.** Ensayo de doble híbrido donde se co-transformaron los plásmidos pGADT7 y pGBKT7 que contienen las secuencias codificantes de la proteína JAZ6 completa así como los fragmentos 1, ZIM y JAS de dicha proteína. También se clonaron las versiones mutadas del motivo EAR, tanto en la versión completa como en el fragmento ZIM. Los transformantes fueron sembrados en medio mínimo SD-Leu-Trp como control de crecimiento (-2) o en medio selectivo SD-Leu-Trp-His-Ade (-4) para comprobar las posibles interacciones. **b.** Membranas de WB reveladas con anticuerpo anti-HA donde se observa la proteína TPL::HA recuperada después de ensayos de PD donde se usaron plantas transgénicas que sobre-expresan TPL::HA (T) o WT (Ler; L) y las proteínas recombinantes MBP, JAZ5, JAZ6 y sus correspondientes fragmentos fusionados a MBP.

Para descartar que el dominio EAR intervenga en la formación de homo-dímeros entre las distintas proteínas JAZs, se realizaron ensayos de PD con extractos de plantas que sobre-expresan JAZ6 fusionada al epítipo HA, y las proteínas recombinantes JAZ6 salvaje y JAZ6 con el dominio EAR tipo DLNEP mutado, fusionadas a MBP. Como se observa en la figura 41, la mutación de dicho dominio no afecta a la homo-dimerización de JAZ6. Esto indica que dichos residuos no son esenciales para que las proteínas JAZ interactúen entre ellas.

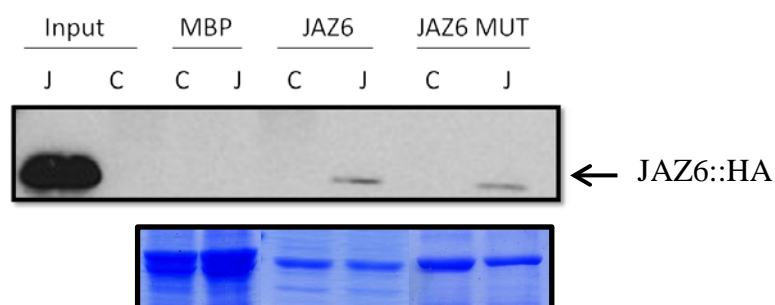


Figura 41. El dominio EAR no interviene en la homo-dimerización de JAZ6. Membrana de WB revelada con anticuerpo anti-HA donde se observa la proteína JAZ6::HA recuperada después de ensayos de PD donde se usaron plantas transgénicas que sobre-expresan JAZ6::HA (J) o WT (Col-0; C) y las proteínas recombinantes MBP, JAZ6 y JAZ6 mut fusionadas a MBP. En la línea inferior se muestran geles teñidos con Coomassie donde se observa la cantidad de proteína recombinante usada.

3.3.2.2. Caracterización fenotípica de los mutantes de pérdida y ganancia de función en los genes *JAZ5* y *JAZ6*

Los resultados obtenidos sugieren que *JAZ5* y *JAZ6* podrían jugar un papel específico en la regulación de las respuestas a JA, a través de un mecanismo alternativo al de los complejos JAZ-NINJA-TPL. Para comprobar esta hipótesis se obtuvieron líneas amiARN en el laboratorio del Dr. Micoll silenciadas para los alelos *JAZ5* y *JAZ6*, y posteriormente se seleccionó en el laboratorio la progenie de plantas homocigotas para los dos genes y se comprobó por RT-PCR la pérdida de expresión para ambos genes en distintas líneas (figura 42a). Además, se generaron líneas transgénicas estables de *Arabidopsis* que expresaban *JAZ5* o *JAZ6* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) fusionadas al epítipo GFP (figura 42b). Para llevar a cabo los análisis se usaron las líneas amiARN 3 y 4, y las líneas de sobre-expresión 3, para *JAZ5* y 1 para *JAZ6* (figura 42). En estas líneas se estudiaron varias respuestas reguladas por JA como son, inhibición del crecimiento de la raíz, acumulación de antocianinas, peso fresco y defensa frente a hongos.

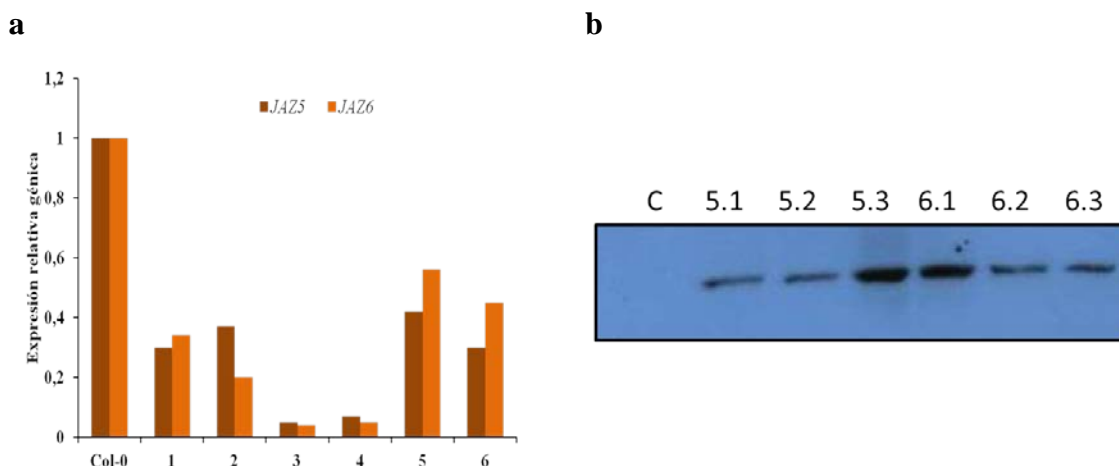


Figura 42. Niveles de expresión de los genes *JAZ5* y *JAZ6* en las líneas de silenciamiento amiARN y de sobre-expresión. a. RT-PCR cuantitativa para la expresión de los genes *JAZ5* y *JAZ6* en distintas líneas homocigotas amiARN *JAZ5/JAZ6* de *Arabidopsis* (líneas 1, 2, 3, 4, 5 y 6). Las columnas muestran los niveles de expresión de cada gen analizado respecto a su control interno. Se muestran los datos de tres réplicas técnicas correspondientes a una réplica biológica. **b.** Membrana de ensayo de WB revelada con anticuerpo anti-GFP donde se muestran los niveles de expresión proteica de distintas líneas transgénicas de sobre-expresión para *JAZ5* (5.1; 5.2 y 5.3) y *JAZ6* (6.1, 6.2 y 6.3).

3.3.2.2.1. Inhibición del crecimiento de la raíz mediada por JA o COR

Las medidas de la raíz de plántulas de las líneas amiARN *JAZ5/JAZ6* y 35S::*JAZ5* o 35S::*JAZ6* crecidas en presencia de JA o COR (o en su ausencia; control) mostraron que las líneas amiARN seleccionadas muestran diferencias significativas con el WT (hipersensibilidad) a concentraciones altas de JA (figura 43). Las líneas que sobre-expresan las proteínas *JAZ5* o *JAZ6* son insensibles a COR en comparación al control Col-0 usado, pero no se observan diferencias significativas cuando son crecidas en presencia de JA (figura 43).

Estos resultados indican que las proteínas *JAZ5* y *JAZ6* podrían ejercer en la raíz una posible función represora de la señalización de la hormona.

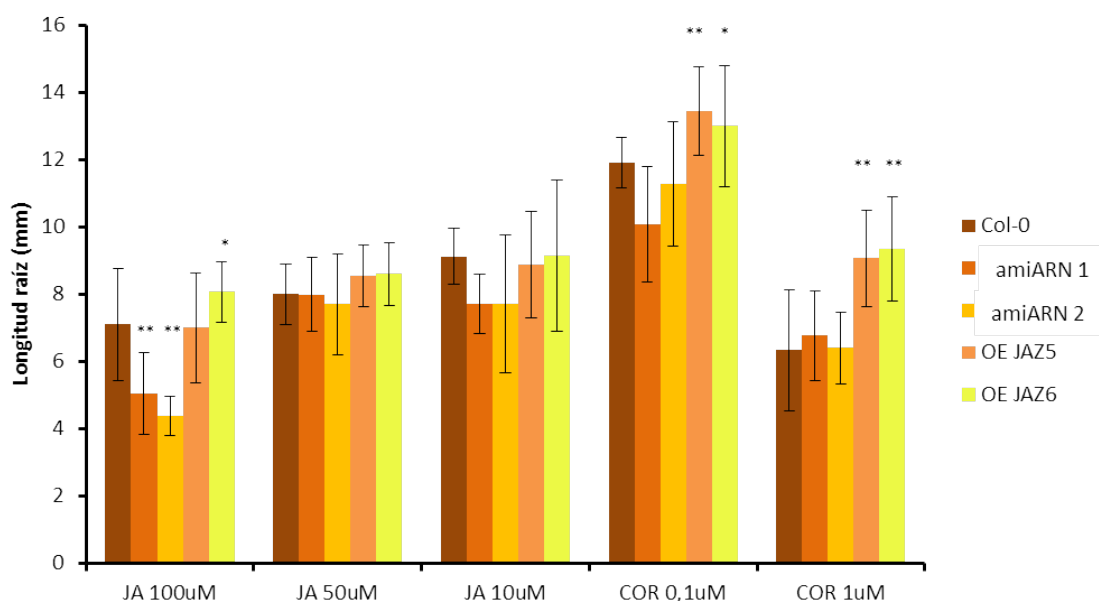


Figura 43. Ensayo de inhibición del crecimiento de la raíz en presencia de hormona en las líneas de silenciamiento amiARN JAZ5/JAZ6 y de sobre-expresión JAZ5::GFP y JAZ6::GFP. Plántulas de *Arabidopsis* Col-0, dos líneas de sobre-expresión de JAZ5 o JAZ6 y dos líneas amiARN JAZ5/JAZ6 fueron crecidas durante 8 días en medio Johnson control o en presencia de JA o COR a las concentraciones indicadas. Los datos se representan en forma de media±d.s. n=20-25 y son el resultado de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la significancia estadística en comparación con Col-0 (test t de Student * $P \leq 0,01$, Student ** $P \leq 0,001$).

3.3.2.2.2. Peso fresco

El tratamiento con JA-Ile provoca una reducción del crecimiento y, por tanto, del peso fresco de la planta. Por ello, se analizó el efecto del JA en la reducción del peso fresco cuantificando la relación del peso fresco de plántulas antes y después de ser tratadas con JA. Se utilizaron plántulas de las líneas amiARN JAZ5/JAZ6, OE::JAZ5 y OE::JAZ6 y se compararon con las líneas control Col-0 y *jin1-2*. Como se muestra en la figura 44, solo se observaron diferencias significativas en las líneas de sobre-expresión, lo que sugiere que JAZ5 y JAZ6 son represores de la respuesta a la hormona, cuya función es redundante con la de otros JAZs.

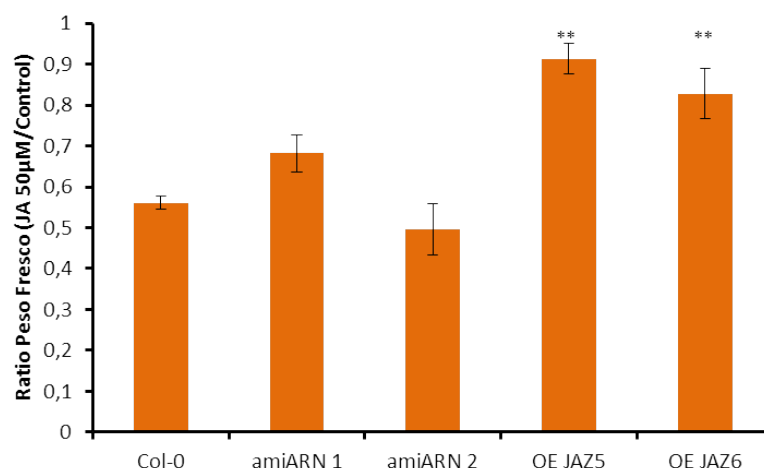


Figura 44. Efecto del JA en la reducción del peso fresco de las líneas de silenciamiento amiARN JAZ5/JAZ6 y de sobre-expresión JAZ5::GFP y JAZ6::GFP. Plántulas de *Arabidopsis* Col-0, las líneas de sobre-expresión de JAZ5 o JAZ6 y dos líneas amiARN JAZ5/JAZ6 fueron crecidas durante 8 días en medio Johnson control o en presencia de JA 50µM. Los datos se representan como la relación entre plántulas tratadas con JA 50µM/plántulas sin tratar, donde $n=20-25$ y son el resultado de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la significancia estadística en comparación con Col-0 (test t de Student * $P \leq 0,01$, Student ** $P \leq 0,001$).

3.3.2.2.3. Infección por *Botrytis cinerea*

Se estudió también la respuesta de las líneas amiARN y sobre-expresión para JAZ5 y JAZ6 a la infección con el hongo necrotrófo *Botrytis cinerea*, que activa en la planta defensas dependientes de JA. De acuerdo con publicaciones anteriores (Yang y col., 2012) el mutante *coi1-30*, insensible a JA, muestra mayor susceptibilidad al hongo que plantas WT (Col-0), lo que se traduce en una mayor producción de esporas cinco días después de la infección (figura 45). Las líneas 35S:JAZ5::GFP y 35S:JAZ6::GFP mostraron una acumulación de esporas significativamente superior a los controles WT, aunque no tan acusada como en el mutante *coi1-30*. En el caso de las plántulas amiARN JAZ5/JAZ6 no se observaron diferencias significativas. Estos resultados concuerdan con una función represora de las proteínas JAZ5 y JAZ6 en parte aérea.

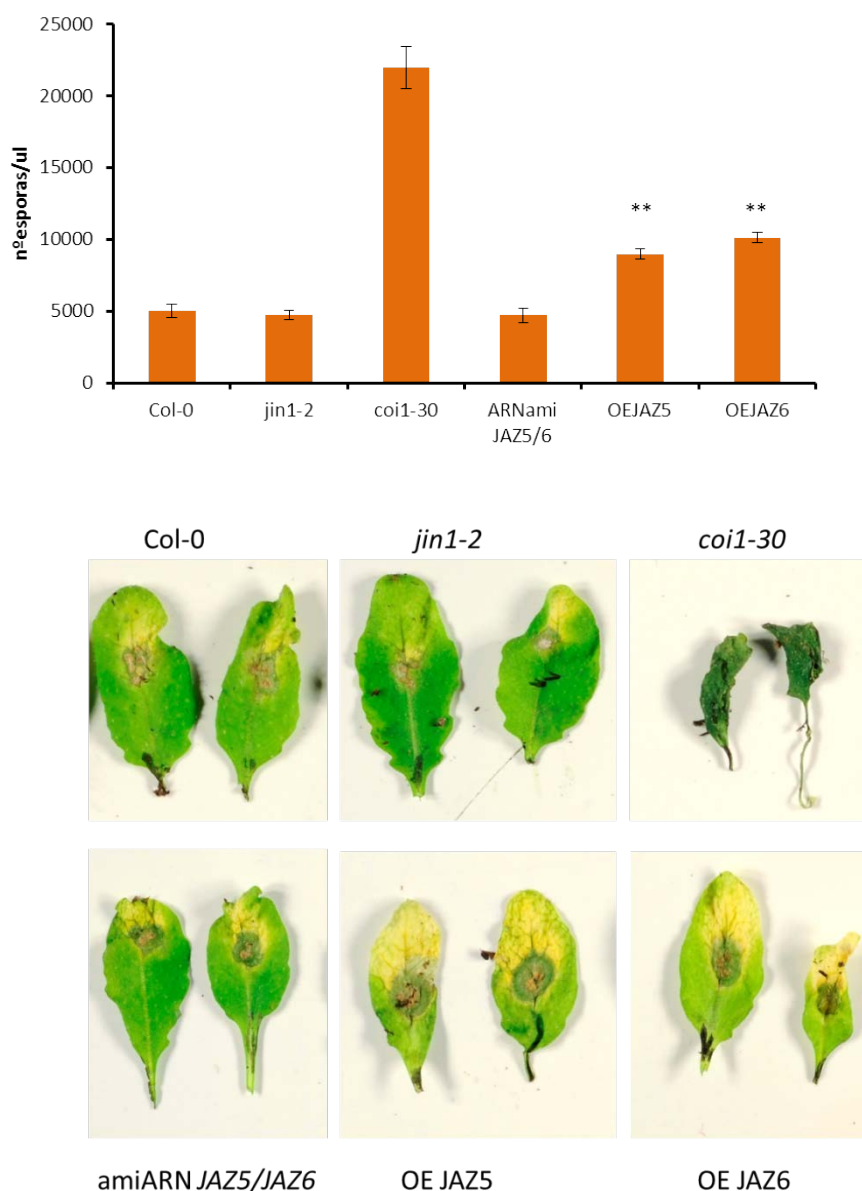


Figura 45. Ensayo de infección por el hongo necrotrofo *Botrytis cinerea* en las líneas de silenciamiento amiARNJAZ5/JAZ6 y de sobre-expresión JAZ5::GFP y JAZ6::GFP. a. Representación del número de esporas infectivas a los cinco días de la inoculación en 15 hojas de cada genotipo utilizado. Los datos se representan en forma de media \pm d.s. n=15 y son el resultado de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas en comparación con Col-0 (test t de Student * $P \leq 0,01$, Student ** $P \leq 0,001$). **b.** hojas infectadas de cada uno de los genotipos a los cinco días de la inoculación con el hongo.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos para las plantas transgénicas de sobre-expresión de JAZ6 Δ Jas que se muestran en la figura 11, y que apoyan el papel represor de JAZ6. Por tanto, en conjunto, los resultados obtenidos en los análisis fenotípicos sugieren que las proteínas JAZ5 y JAZ6 se comportan como represores transcripcionales

de la vía de señalización del JA, involucrados en la inhibición del crecimiento de la raíz y de la parte aérea, y en la defensa frente a patógenos necrotrofos.

3.3.2.2.4. Acumulación de antocianinas mediada por JA y COR

Ni en condiciones control, ni tras los tratamientos con JA o COR, ninguno de los genotipos analizados (líneas amiARN *JAZ5/JAZ6*, y de sobre-expresión OE::*JAZ5* y OE::*JAZ6*) presentaba diferencias significativas con respecto a los controles WT en cuanto a la acumulación de antocianinas (figura 46).

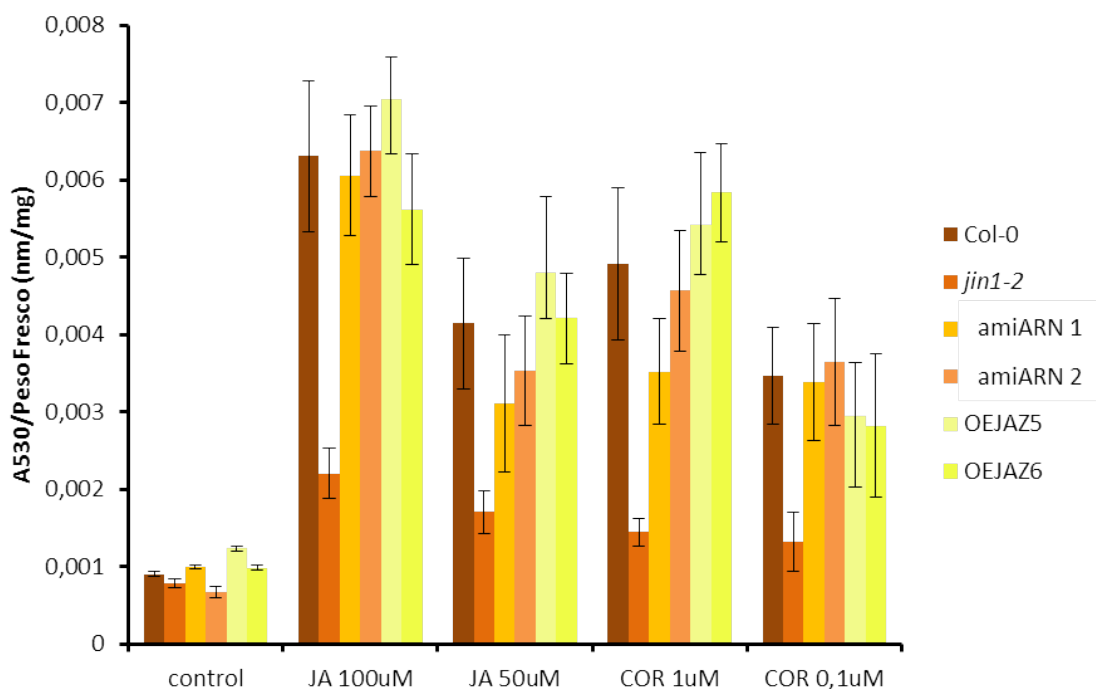


Figura 46. Ensayo de acumulación de antocianinas en presencia de hormona en las líneas de silenciamiento amiARN *JAZ5/JAZ6* y de sobre-expresión *JAZ5::GFP* y *JAZ6::GFP*. Plántulas de *Arabidopsis* Col-0, dos líneas de sobre-expresión de *JAZ5* o *JAZ6* y dos líneas amiARN *JAZ5/JAZ6* (amiARN 1 y amiARN 2) fueron crecidas durante 12 días en medio Johnson control o en presencia de JA o COR a las concentraciones indicadas. Los datos se representan en forma de media±d.s. n=20-25 y son el resultado de tres experimentos independientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas utilizando t de Student.

3.3.3. Interactores adicionales de TPL: posibles mecanismos de represión

Algunos estudios sugieren que TPL podría reprimir la transcripción mediante el reclutamiento de proteínas Histona Deacetilasas (HDA). Además, estudios recientes han demostrado que algunas de estas proteínas (ej: HDA6 y HDA19) podrían estar

implicadas en los mecanismos de represión de la ruta de señalización de JA (Long y col., 2006; Wu y col., 2008; Krogan y col., 2012). Para comprobar si TPL interacciona con la HDA6 se llevaron a cabo ensayos de doble híbrido en levaduras y PD. En ambos casos, los resultados sugieren que ambas proteínas interactúan de una forma directa (figura 47). Como se observa en la figura 47a, las levaduras co-transformadas con los plásmidos que expresan el co-represor TPL y la proteína HDA6 son capaces de crecer en medio mínimo -4. Por otra parte, la proteína recombinante HDA6 es capaz de arrastrar a la proteína TPL::HA en ensayos de PD (figura 47b). Como control positivo de interacción con TPL, en estos experimentos se usó el fragmento ZIM de la proteína JAZ6 (J6ZIM), y como control negativo se usó el fragmento ZIM con el dominio EAR mutado de la proteína JAZ6 (J6ZIM_M).

Estos resultados confirman que TPL puede interactuar directamente con HDAs, y por tanto, apoyan la hipótesis de que su función represora se ejerce a través del reclutamiento de HDAs y la modificación de la cromatina por de-acetilación de histonas.

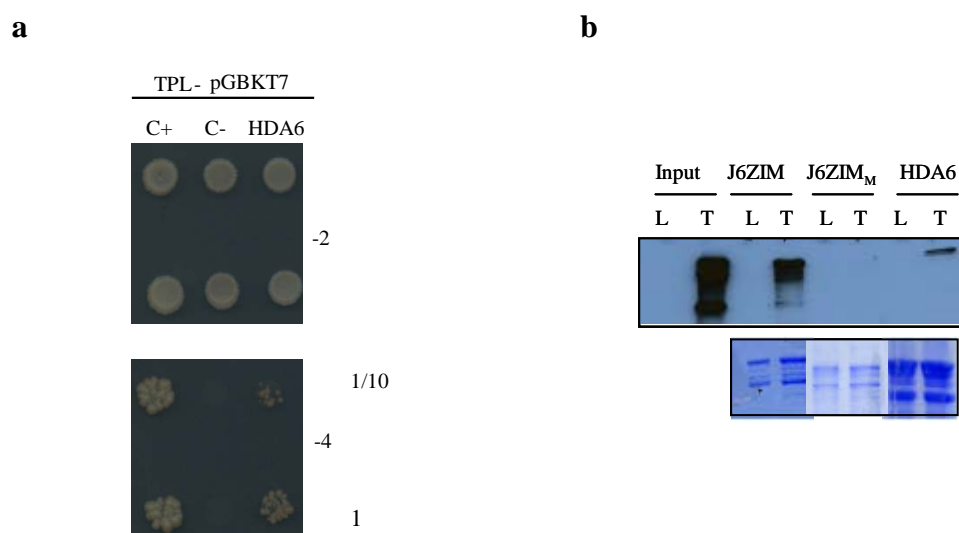


Figura 47. Interacción de TPL con la proteína HDA6. **a.** Ensayo de doble híbrido donde se co-transformaron los plásmidos pGADT7::HDA6 y pGBKT7::TPL. Los transformantes fueron sembrados sin diluir y a una dilución 1/10 en medio mínimo SD-Leu-Trp como control de crecimiento (-2) o en medio selectivo SD-Leu-Trp-His-Ade (-4), para comprobar las posibles interacciones. Como control positivo (C+) se usó pGAD::JAZ6, como control negativo (C-) se usó PGAD::JAZ1 **b.** Membranas de Western blot reveladas con anticuerpo anti-HA donde se observa la proteína TPL::HA recuperada después de ensayos de PD donde se usaron plantas transgénicas que sobre-expresan TPL::HA (T) o WT (Ler; L) y las proteínas recombinantes MBP::JAZ6.ZIM (J6ZIM), MBP::JAZ6.ZIM con el dominio EAR mutado (J6ZIM_M) y MBP::HDA6 (HDA6). En la línea inferior se muestran geles teñidos con Coomassie donde se observa la cantidad de proteína recombinante.

4. Discusión

4.1. La familia de represores JAZs

La identificación de la familia de proteínas JAZs supuso un gran avance en la comprensión de los mecanismos moleculares que median la señalización del JA, ya que por primera vez se demostró la existencia de una familia de represores que enlazaban la percepción de la hormona con los FT que activan las respuestas a JA (Thines y col., 2007; Chini y col., 2007; Yan y col., 2007). El descubrimiento de las proteínas JAZs proporcionó, por tanto, el nexo de unión entre los dos componentes mejor caracterizados hasta el momento en el que se inició esta tesis, el complejo SCF^{COI} y el FT MYC2 (Devoto y col. 2002; Lorenzo y col. 2004; Lorenzo y col., 2005).

En este trabajo se ha caracterizado el mutante dominante *jai3-1*, identificado previamente mediante cribado genético en *Arabidopsis*. Este mutante generaba una proteína JAZ3 truncada, carente del dominio Jas, que daba lugar a un fenotipo de insensibilidad a JA y una deficiencia en la respuesta transcripcional a la hormona (Chini y col., 2007). Además, la sobre-expresión de la proteína JAZ3 completa no presentaba ninguna alteración relacionada con la ruta del JA, pero la sobre-expresión en plantas de *Arabidopsis* de la proteína truncada JAZ3 Δ C (sin dominio Jas) le confería a las plantas un fenotipo de insensibilidad a JA similar al de *jai3-1* (figura 3). Esto confirmó la importancia de dicho dominio para la regulación de la funcionalidad de la proteína y sugería que las proteínas JAZs podrían comportarse como reguladores negativos de la señalización del JA (Chini y col., 2007). Por el contrario, en el mutante de pérdida de función de la proteína completa no se ve alterada la sensibilidad de la planta al JA, lo que sugiere una redundancia funcional con los demás miembros de la familia JAZ (Chini y col. 2007; Thines y col. 2007) (figura 3).

La naturaleza dominante negativa del mutante *jai3-1*, la localización nuclear de la proteína JAZ3, así como la ausencia de un dominio de unión a DNA sugería que las proteínas de la familia JAZ podrían comportarse como represores de FTs reguladores de las respuestas a JA (Chini y col. 2007; Thines y col., 2007; Yan y col., 2007). Ensayos de interacción proteína-proteína confirmaron que el FT MYC2 era diana directa de las proteínas JAZs (figura 13). Análisis transcriptómicos demostraron que los genes reprimidos en respuesta a JA en el mutante *jai3-1* corresponden a genes regulados positivamente por MYC2 (figura 16), lo que sugería que JAZ3 regula negativamente la actividad de MYC2.

Por otra parte, los análisis transcriptómicos mostraron una alteración de la expresión de genes *JAZ* en fondos con actividad *MYC2* alterada, lo que sugería miembros de la familia *JAZ*, son dianas transcripcionales de *MYC2*, y que por tanto la vía de señalización de los JAs está regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa, en el que están implicadas las proteínas *JAZs* y *MYC2*. Los ensayos de unión a DNA y retardo en gel (EMSA) confirmaron que *MYC2* se une a las caja G y T/G, que se encuentra sobre-representada en la secuencia promotora del gen *JAZ3* y otros miembros de la familia *JAZ* (figura 17).

La identificación de la familia de proteínas *JAZs* proporcionó por tanto una nueva herramienta para poder identificar nuevos FT implicados en la regulación de JA. Debido a que los mutantes de pérdida de función *myc2* no están afectados en todas las respuestas a JA, otros FTs podrían participar en la regulación por la hormona. Mediante las técnicas de interacción proteica de cribado en levaduras y *TAP-tagging* usando las proteínas *JAZs* como cebo, se identificaron los FT *MYC3* y *MYC4*, que actúan aditivamente con *MYC2* en la regulación de distintas respuestas a JA (Fernández-Calvo y col., 2011; Cheng y col., 2011; Niu y col., 2011). Además, mediante ensayos de PD, se demostró que la mayoría de las proteínas de la familia *JAZ* son interactores directos de *MYC3* y *MYC4* (figura 15). No obstante, puesto que en los triples mutantes *myc2myc3myc4* algunas respuestas a JA no están completamente bloqueadas como en *coi1* (como por ejemplo la viabilidad del polen) se espera que existan otras dianas de las proteínas *JAZs*, al menos en tejidos concretos o en determinados procesos de desarrollo. En estudios recientes se ha demostrado que otras proteínas bHLH (*bHLH003*, *bHLH013* y *bHLH017*), FT de la familia MYB, y los FT *TT8*, *GL3*, *EIN3* y *EIL1* interaccionan con los represores *JAZs* y participan en la regulación de diversos procesos mediados por JA como son la acumulación de antocianinas, formación de tricomas, el desarrollo de estambres, la producción de pelos radiculares y la defensa frente a hongos necrotrofos (Qi y col., 2011; Song y col., 2011; Zhu y col., 2011; Fonseca y col., 2014).

La identificación de *COI* como una *F-box* que formaba parte del complejo SCF E3 ubiquitin ligasa (Xie y col., 1998) sugirió que debía existir un represor de la vía de señalización del JA. Este hipotético represor sería la diana del complejo SCF^{COI} que se degradara en respuesta a JA vía proteasoma dando lugar a la activación transcripcional mediada por la hormona. En este trabajo se han identificado las

proteínas JAZs como dianas directas de COI1 mediante ensayos de interacción proteína-proteína tipo PD, lo que proporcionó la evidencia experimental que confirmaba dicha hipótesis (figura 5; Chini y col. 2007). Así, en plántulas de *Arabidopsis* que sobre-expresan JAZ3::GFP se observa que tras tratamiento con JA la señal nuclear desaparece rápidamente. Sin embargo, esta degradación no tiene lugar cuando las plántulas son tratadas con inhibidores específicos del proteasoma (MG132) o cuando la proteína JAZ3::GFP es sobre-expresada en el fondo mutante *coi1-1*, lo que confirmaba que tanto COI1 como el proteasoma son esenciales para la degradación de JAZ3 en presencia de JA (Chini y col., 2007) (figura 7). Además de JAZ3, trabajos posteriores han demostrado que otros miembros de la familia JAZ también son degradados mediante el complejo SCF^{COI1} y el proteasoma (Chini y col., 2007; Thines y col., 2007; Chung y col. 2008; Chung y Howe, 2009; Chung y col., 2010; Shyu y col., 2012; Moreno y col., Chung y col., 2010; Moreno y col., 2013). Este trabajo, por tanto, aportó la primera evidencia experimental que unía la actividad de COI1 con la activación transcripcional a través de los represores JAZs.

Un hecho importante a tener en cuenta es que, a diferencia de las proteínas JAZs completas, la integridad de las versiones truncadas carentes del motivo Jas no se vio afectada tras el tratamiento con JA. Estos resultados sugieren que el motivo Jas es necesario para la interacción con COI y su posterior degradación por el proteasoma, lo cual se ha confirmado posteriormente en numerosas publicaciones (Chini y col., 2007; Melotto y col., 2008; Chung y Howe, 2009; Chung y col., 2010; Chini y col., 2009b; Fonseca y col., 2009b; Shyu y col., 2012). Además, estos resultados sugirieron que la degradación de JAZ3 y del resto de las proteínas de la familia JAZ es necesaria para que se active la vía de señalización de JA, y las formas truncadas (sin dominio Jas) resistentes a degradación mantienen reprimida la ruta y provocan un fenotipo de insensibilidad a la hormona (Chini y col. 2007).

La función del dominio Jas esta conservada en otras plantas. En tomate, la región C-terminal de la proteína homóloga SlJAZ3, que contiene el motivo Jas, es suficiente para promover la interacción con SlCOI1 de una manera dependiente de hormona (Katsir y col., 2008).

Una pregunta importante aún sin respuesta es cómo las proteínas JAZs que carecen del motivo Jas causan insensibilidad a JA en la planta. El dominio Jas es necesario no solo para la interacción con COI1, como se describe anteriormente, sino también para la interacción tanto con los FT (Chini y col., 2007; Sheard y col., 2010). Por tanto, la falta de este dominio debería evitar la interacción con los FTs y por tanto su represión.

Una posible hipótesis es que la proteína generada en el mutante *jai3-1* (y otros JAZs truncados) provoque la estabilización de otras proteínas JAZs por hetero-dimerización a través del dominio ZIM (Chini y col. 2009a). Esta hipótesis está apoyada por los resultados de la figura suplementaria 3 que muestran como la expresión transitoria de JAZ3ΔJas en *Nicotiana bethamiana* favorece la estabilidad de las proteínas JAZ1 y JAZ9 con las que JAZ3ΔJas puede formar hetero-dímeros (Chini et al., 2009a). Como el dominio Jas es esencial para la interacción con COI y con MYC2, las proteínas JAZΔJas resistentes a la degradación podrían interaccionar con MYC2 a través de la hetero-dimerización con las proteínas completas JAZs, reprimiendo de forma constitutiva la transcripción dependiente de JA (Chini y col., 2007; Chini y col. 2009a; Chung et al., 2009; Chung and Howe, 2009). Alternativamente, las proteínas JAZs cuya versión truncada provoca insensibilidad a JA podrían tener otro dominio que les permitiese interaccionar con MYC2 u otros FTs. En apoyo de esta hipótesis, se ha demostrado que JAZ1 posee un dominio Jas críptico que le permite interaccionar con MYC2 (Melotto y col., 2008). Sin embargo, este no es el caso de JAZ3, cuya versión truncada no tiene ese dominio críptico Jas y hemos comprobado que no interacciona con ninguno de los FTs descritos hasta el momento. Trabajos muy recientes muestran que JAZ3 puede interaccionar con nuevos FTs a través del dominio ZIM (Boter y col, manuscrito en revisión), lo cual probablemente sea clave para entender el fenotipo de insensibilidad de *jai3-1*.

Cómo se logra la especificidad en la regulación de los procesos de respuesta a JA en la planta sería otra cuestión interesante a resolver. En la regulación de este proceso podría participar por una parte, la diversidad y especificidad de interacciones entre los distintos FT descritos y las proteínas JAZs, los diferentes ratios de degradación de los JAZs, así como la especificidad tisular de los patrones de expresión de ambos tipos de proteínas (Lorenzo y col., 2004; Chini y col., 2007; Fernández-Calvo y col., 2011; Sasaki-Sekimoto y col., 2013; Niu y col., 2011; Song y col., 2011; Qi y col., 2011). Además, se

ha descrito la existencia de distintas isoformas de los represores JAZs (por ejemplo, JAZ10) generadas por *splicing* alternativo que son más estables que las proteínas JAZ completas y que interaccionan de manera distinta con otros componentes de la ruta de señalización de JA (Yan y col., 2007; Chung and Howe, 2009; Chung y col., 2010). Potencialmente, estas isoformas de los represores JAZs pueden contribuir también a la intensidad y especificidad de respuesta, optimizando por tanto su capacidad de adaptación a distintos estreses ambientales (Yan y col., 2007; Chung and Howe, 2009; Chung y col., 2010).

La identificación de la familia JAZ también ha ayudado a entender cómo tiene lugar la percepción del JA. Desde la identificación de TIR1 como el receptor de Auxina (Kepinski y col., 2005; Tan et al., 2007), la similitud de secuencia entre COI1 y TIR1 indicó que SCF^{COI1} podría ser el receptor de la vía de señalización de JA. De este modo, la resolución cristalográfica de la estructura de COI1 ha revelado que esta proteína es el co-receptor de JA-Ile, la hormona bioactiva, junto con las proteínas JAZs (Sheard et al., 2010).

4.2. El complejo co-represor NINJA-TOPLESS

En la búsqueda de nuevos componentes reguladores del JA, se identificó simultáneamente en dos laboratorios y mediante dos métodos distintos (cribado en levadura en el CNB y TAP-tagging en el VIB) la proteína NINJA como interactor de las proteínas JAZs. NINJA participa en la regulación negativa de la señalización del JA actuando como un adaptador que conecta a los represores JAZs con los co-represores generales TPL/TPR a través de su dominio EAR (Pauwels y col., 2010). Además, estudios posteriores en los que se ha identificado un mutante *ninja* han confirmado que NINJA tiene un papel crucial en la represión del crecimiento de la raíz regulada por JA además de promover la elongación y el crecimiento de las células de la raíz (Acosta y col., 2013).

Por tanto, la identificación de NINJA como una proteína adaptadora que recluta a las proteínas TPL y TPR para formar, junto con las proteínas JAZs, el complejo represor de los FTs MYC, ha permitido obtener una explicación molecular del mecanismo de represión de la respuesta transcripcional dependiente de JA. Además, ha puesto de manifiesto cómo múltiples vías de señalización hormonal pueden utilizar mecanismos

similares para reprimir la expresión génica, ya que los co-represores TPL/TPR pueden ser reclutados a distintas vías mediante distintas combinaciones de proteínas adaptadoras y represoras (Pauwels et al., 2010).

En este trabajo se ha demostrado por ensayos de PD y dos híbridos en levadura que el dominio ZIM (o TIFY) de las proteínas JAZs está implicado en la interacción con NINJA, además de constituir un dominio de dimerización (figura 23 y 24) (Chini y col., 2009a; Howe y col., 2009; Pauwels y col., 2010). Esto abre un camino a futuros ensayos para describir si la homo y hetero-dimerización entre las proteínas JAZs y NINJA tienen lugar de forma simultánea y cómo la funcionalidad dual del dominio TIFY podría determinar la actividad represora del complejo.

De forma adicional, NINJA también interacciona con las proteínas PPD1, PPD2 y TIFY8, a través de su dominio TIFY. Dichas proteínas no son inducibles por JA y los fenotipos que muestran las plantas de sobre-expresión o mutantes para dichas proteínas no parecen estar relacionados con la señalización de JA (White, 2006; Cuéllar-Pérez y col., 2014). Esto hace suponer que la proteína NINJA podría participar en la regulación de otras vías de señalización además de la de JA.

En *Arabidopsis*, la familia TPL y TPR (*TPL-related*) está formada por cinco proteínas (TPL y TPR1-4) que pertenecen a la superfamilia de co-represores Groucho (Gro)/Tup1 caracterizados por interaccionar con complejos transcripcionales que participan en la regulación hormonal de auxinas y JA, regulación de la homeostasis del meristemo, modulación de la expresión génica y respuestas de defensa dependientes de JA y ciclo circadiano (Long y col., 2002; Kieffer et al., 2006; Long et al., 2006; Szemenyei et al., 2008; Gallavotti et al., 2010; Pauwels et al., 2010; Zhu et al., 2010; Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011; Wang y col., 2012). Los co-receptores TPL/TPR están involucrados en la represión de la expresión génica mediante la interacción directa o indirecta con FTs. La interacción entre los co-represores TPL/TPR y las proteínas de las distintas rutas que regula (SUPERMAN, AGL15, NIMIN, WUS, AUX/IAA, NINJA, RAMOSA1, HDA...) se realiza mediante un motivo aminoácido conservado denominado dominio EAR (*ethylene response factor (ERF)-associated amphiphilic repression*) (Ohta y col., 2001), con una secuencia consenso LxLxL o DLNxxP. Dichas proteínas actúan como reguladores negativos de la expresión génica

modulando un amplio rango de procesos fisiológicos y de desarrollo en plantas (Ohta y col., 2001; Hiratsu y col., 2003; Hill y col., 2008; Szemenyei y col., 2008; Kagale y col., 2010).

Se ha demostrado por distintos ensayos de interacción proteína-proteína que el dominio EAR de la proteína NINJA está implicado en la formación de complejos con las proteínas co-represoras TPL y TPR (Pauwels y col., 2010). Por tanto, NINJA actuaría como una proteína adaptadora entre las proteínas JAZs y el co-represor TPL, dando lugar al tándem JAZ-NINJA-TPL, que se comportaría como la maquinaria represora de la vía de señalización de JA. Además, las líneas de sobre-expresión o de reducción de función de *NINJA* presentan un fenotipo de respuesta a JA acorde al de una proteína con función represora (Pauwels y col., 2010).

En la ruta de las auxinas, el motivo EAR de las proteínas AUX/IAA también es el responsable de la interacción con TPL (Long y col. 2006). Este motivo también está conservado en las proteínas AFP, que han sido descritas como integradoras de la vía de señalización de ABA, y que interaccionan de forma directa con TPL (López-Molina y col., 2003). A pesar de ser homólogos de NINJA, las proteínas AFP no interaccionan con las proteínas JAZs (Pauwels et al., 2010). Estos resultados sugieren que la proteína TPL se comporta como un co-represor general en plantas que es reclutado por distintas proteínas adaptadoras específicas de cada ruta de señalización hormonal, como las AUX/IAA en el caso de las auxinas, las proteínas AFP en el ruta de señalización de ABA y el complejo NINJA-JAZ para la vía de JA (Pauwels y col., 2010) (figura 48).

El mecanismo mediante el cual TPL es capaz de reprimir la expresión génica no ha sido demostrado hasta el momento. Algunos estudios sugieren que el efecto represor de TPL podría deberse a modificaciones en los niveles de acetilación de la cromatina. En este sentido, se ha demostrado que TPL interacciona con la proteína Histona Deacetilasa 6 (HDA6), que se ha descrito que participa en la regulación de la transcripción de la vía del JA mediante interacción con la proteína JAZ1 (Zhu et al., 2011). Otros trabajos han descrito que la proteína Histona Deacetilasa 19 (HDA19) es un supresor del fenotipo de TPL en el desarrollo embrionario (Long y col., 2006). También ha sido descrito que TPL puede formar complejos con la HDA6 (*HISTONE DEACETYLASE 6*) y participar en la regulación del ritmo circadiano (Wang y col., 2012), o con HDA19 y regular el

desarrollo floral (Kronan y col., 2012). Por otra parte, se ha demostrado una interacción directa entre TPL y Jumonji8, una histona demetilasa (Macrae and Long, 2011). Todos estos análisis sugieren que la represión ocurre por deacetilación de la cromatina que impide el reclutamiento y la progresión de la ARN polimerasa II por MYC2.

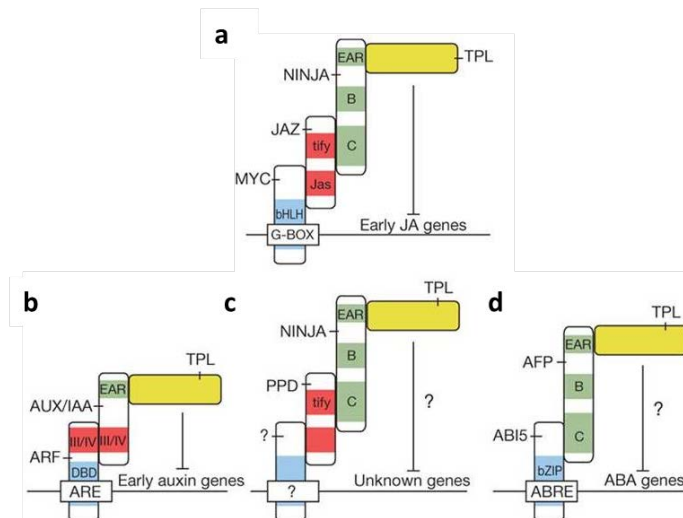


Figura 48. Modelo de la función de NINJA y TPL en la represión de la señalización de JA y otras vías. a. Los FT MYC interaccionan con el dominio Jas de las proteínas JAZ, que a su vez interaccionan a través de su motivo TIFY con el dominio C de la proteína adaptadora NINJA. El motivo EAR de NINJA es esencial para la interacción con el co-represor TPL. c. El complejo represor de la ruta de señalización de las auxinas es similar al de la ruta del JA, pero en este caso los represores Aux/IAA interaccionan directamente con TPL. d. NINJA interacciona con otras familia de la familia TIFY, que se unen a distintos FT. e. Interacción de las proteínas AFP relacionadas con NINJA con el FT ABI5, en la regulación de la señalización hormonal de ABA.

Con todos los datos obtenidos hasta el momento, se ha propuesto un mecanismo de regulación de la transcripción de los genes inducibles por JA, donde en un estado basal el complejo JAZ-NINJA-TOPLESS interaccionaría con los FT MYC reprimiendo su activación. Los complejos homo o hetero-diméricos que forman las proteínas JAZs interaccionan con los FT MYC a través de su dominio Jas. A su vez, las proteínas JAZs interaccionan a través de su dominio ZIM con el dominio C de NINJA, que forma complejos con TPL a través de su motivo EAR. En condiciones de estrés, JAR1 aumentaría los niveles de (+)-7-*iso*-JA-Ile en el medio lo que favorecería la formación

de los complejos JAZ-CO11. Las proteínas JAZs serían ubiquitinadas y posteriormente degradadas por el proteasoma, liberando a los FT MYC del complejo represor NINJA-TPL e induciéndose por tanto la transcripción de los genes de respuesta temprana a JA, entre los que se encuentran los propios genes *JAZ*. La síntesis *de novo* de proteínas JAZs favorecería la formación de nuevos complejos represores JAZ-NINJA-TPL-MYC2, lo que provoca la inactivación de MYC2, por un mecanismo de retroalimentación negativa, dando lugar a la inhibición de la respuesta a JA. Este mecanismo propuesto de actuación de la vía del JA esta en línea con el hecho de que la activación de las respuestas a la hormona se lleva a cabo por medio de pulsos de sensibilización-desensibilización de la célula frente a la hormona (figura 49).

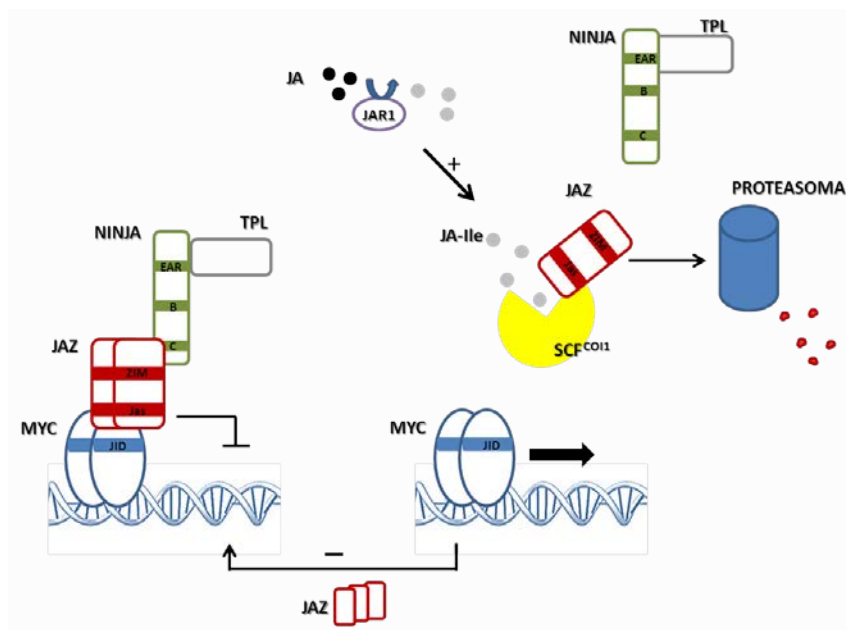


Figura 49. Mecanismo de regulación de la respuesta a JA. En ausencia de estímulo, MYC2 se encuentra reprimido por el complejo represor JAZ-NINJA-TPL. Tras el estímulo, la presencia en el medio de JA-Ile promueve la interacción de las proteínas JAZ con el complejo SCF^{CO11}, esto provoca su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma 26S, por tanto MYC2 se libera del complejo represor y activa la transcripción de genes de respuesta temprana JA, entre los que se encuentran los *JAZ*. La síntesis *de novo* de JAZ provoca la formación del complejo represor JAZ-NINJA-TPL-MYC2, de forma que la respuesta a JA se inhibe (adaptada de Pauwels y col., 2010).

La inactivación de la señalización por JA debe ser un proceso crucial para la supervivencia de la planta, ya que ha desarrollado múltiples mecanismos para llevarlo a cabo. Además del mecanismo de retroalimentación negativa descrito anteriormente, las plantas han desarrollado otras estrategias adicionales como la inactivación metabólica de la hormona bioactiva, el JA-Ile, mediante epimerización, metilación u oxidación (Farmer, 1994; Schulze et al., 2006; Fonseca y col., 2009a; Miersch et al., 2008; Glauser et al., 2008b), que también llevarían a una atenuación de la señalización que controla dicha hormona. Además, se ha descrito la existencia de isoformas de los represores JAZs generadas por *splicing* alternativo, que al menos en el caso de JAZ10, se traduce en distintas proteínas truncadas resistentes a la degradación que actuarían como represores constitutivos de la señalización hormonal (Yan y col., 2007; Chung and Howe, 2009; Chung y col., 2010). De forma adicional, se ha confirmado que la proteína JAZ8 es resistente a la degradación ya que carece del motivo LPIARR, localizado en el dominio Jas, que es esencial para la interacción con COI1 (Shyu y col., 2012). Todos estos mecanismos de atenuación de la señalización de JA evidencian la importancia que tiene para la planta reprimir la actividad de los FTs MYC.

4.3. Mecanismos alternativos de represión: las proteínas JAZ5 y JAZ6

Algunas de las proteínas de la familia JAZ presentan el dominio de represión EAR (JAZ5, JAZ6, JAZ7 y JAZ8), lo que sugiere que puedan interaccionar directamente con TOPLESS sin necesidad de la proteína adaptadora NINJA, lo cual se ha confirmado en este trabajo y otros (Causier y col., 2012; Shyu y col., 2012). Al analizar las secuencias de las proteínas JAZs se observó que JAZ7 y JAZ8 contienen un dominio EAR en su región Nt, mientras que JAZ5 y JAZ6 presentan uno en su región central, de tipo DLNEPT, y otro en la región Ct, de tipo LxLxL (Kagale et al., 2010).

En este trabajo se describe un modelo adicional de represión de la vía de JA, donde las proteínas JAZ5 y JAZ6, a través de su motivo EAR, DLNEPT, son capaces de interaccionar de forma directa con el co-represor TPL. Mediante ensayos de PD y dos híbridos en levadura se ha observado que JAZ5 y JAZ6 no son capaces de mantener la interacción con TPL cuando dicho motivo EAR se encuentra mutado, por lo que este motivo debe ser crucial para la interacción entre ambas proteínas.

El análisis de los fenotipos de inhibición del crecimiento de la raíz en presencia de JA o COR y ensayos de infección con el hongo necrotrofo *B. cinerea* en plántulas *RNAami* y de sobre-expresión muestran que, *JAZ5* y *JAZ6* podrían comportarse como represores de la señalización de JA. Estos fenotipos son débiles, confirmando la redundancia de las proteínas JAZs en la regulación por represión de la vía del JA.

Por tanto, y basándonos en los datos de esta tesis y en interacciones descritas en trabajos recientes (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011; Causier y col., 2012; Shyu y col., 2012), proponemos la existencia de distintos tipos de complejos co-represores de respuestas a JA que reclutan a TPL. Por una parte, la proteína adaptadora NINJA interacciona con las proteínas JAZs y TPL para formar el tándem TPL-NINJA-JAZ represor de los FT MYC (Pauwels y col., 2010). Por otra, las proteínas que poseen el motivo EAR, *JAZ5*, *JAZ6*, *JAZ7* y *JAZ8*, podrían unir TPL a MYC de una forma directa, o mediante hetero-dimerización con otras proteínas JAZs. Estos mecanismos de represión alternativos al tándem TPL-NINJA-JAZ podrían explicar los fenotipos débiles en respuesta a JA que observamos en las plantas transgénicas de sobre-expresión y ARNi de *NINJA* (figura 50; Pauwels y col., 2010).

Además, estos resultados apoyan la hipótesis de que las proteínas JAZs podrían usar diferentes mecanismos de represión para distintos FT, debido a que desde su descubrimiento, se han identificado un gran número de FT que son dianas de los JAZs. Dichos FT no sólo están relacionados con la vía de señalización del JA, sino con otras vías de señalización hormonal, lo que sugiere que los JAZs puedan comportarse como integradores de múltiples respuestas hormonales (Moreno y col., 2009; Qi y col., 2011; Hou y col., 2010; Cerrudo y col., 2012; Hou y col., 2012; Yang y col., 2013; Chico y col., 2014).

La comprensión de los mecanismos por los que las plantas responden dinámicamente a los cambios en el medio ambiente y se adaptan al entorno es un reto importante. Debido al papel crucial que desempeñan las proteínas JAZs en la integración de la señalización frente a diversos estímulos, una tarea fundamental será determinar la especificidad de cada uno de los JAZ en las distintas respuestas de la planta frente a los cambios ambientales (Kazan y Manners, 2012; Campos et al, 2014).

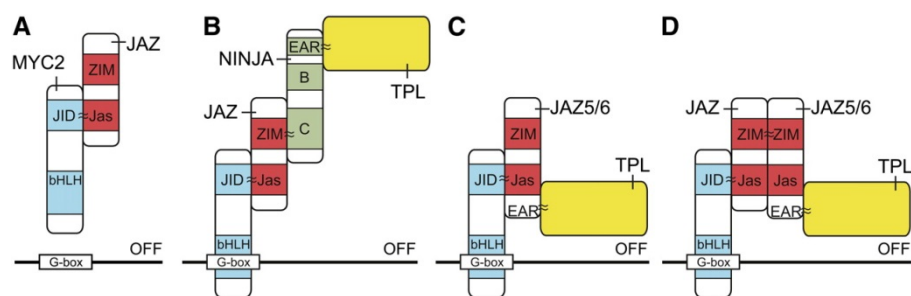


Figura 51. Modelos de represión de las proteínas JAZs. **A.** En ausencia de la hormona, las proteínas JAZs interaccionan con MYC reprimiendo la transcripción génica. **B-D.** En ausencia de JA-Ile, el co-represor TPL es reclutado al complejo represor de MYC mediante proteínas que contienen el motivo EAR. **B.** La proteína NINJA actúa como adaptadora entre el co-represor TPL y las proteínas JAZ. **C.** Algunas proteínas JAZ (como las proteínas JAZ5 y JAZ6) con motivo EAR unen TPL a MYC de una forma directa o **D.** o mediante hetero-dimerización con otras proteínas JAZ (adaptada de Pauwels y col., 2010).

5. Conclusiones

1. JAZ3 y otras proteínas de la familia JAZ interaccionan físicamente con SCF^{COI1} y el factor de transcripción MYC2, enlazando la percepción de la hormona con la activación transcripcional mediada por JA
2. El dominio Jas de las proteínas JAZs es esencial para la interacción con COI1 y MYC2, lo que confirma la importancia de dicho dominio en la regulación de la función de las proteínas JAZs.
3. Las proteínas JAZs actúan como represores de la vía de señalización de los JAs, reprimiendo la actividad de los factores de transcripción MYC2, MYC3 y MYC4.
4. La hormona (JA-Ile) favorece la interacción de JAZ3 y otros JAZs con SCF^{COI1}, promoviendo la ubiquitinación y posterior degradación de los JAZs por el proteasoma 26S.
5. MYC2 se une de forma específica a las cajas G y T/G del promotor de genes *JAZ* y regula su transcripción, lo que genera un bucle de retroalimentación negativa.
6. NINJA interacciona con los represores JAZs y los conecta con los co-represores generales TPL/TPR a través de su dominio EAR. En estado basal, el complejo JAZ-NINJA-TOPLESS interacciona con los FT MYC reprimiendo su actividad.
7. En condiciones de estrés, la presencia de (+)-7-*iso*-JA-Ile favorece la formación de los complejos JAZ-COI1 y la degradación de las proteínas JAZs, liberando a los FT MYC del complejo represor NINJA-TPL e induciéndose, por tanto, la transcripción de los genes de respuesta temprana a JA, entre los que se encuentran los propios genes *JAZ*.
8. La síntesis *de novo* de proteínas JAZs favorecería la formación de nuevos complejos represores JAZ-NINJA-TPL-MYC2, lo que provoca la inactivación de MYC2, por un mecanismo de retroalimentación negativa, dando lugar a la inhibición de la respuesta a JA
9. Las proteínas JAZ5 y JAZ6, a través de su motivo EAR, interaccionan de forma directa con el co-represor TPL, sin necesidad de la proteína adaptadora NINJA, lo que evidencia la existencia de múltiples tipos de complejos de represión.
10. El co-represor TPL podría reprimir la transcripción mediante modificaciones en los niveles de acetilación de la cromatina, reclutando para ello las proteínas Histona Deacetilasas (HDA) a la maquinaria represora.

6. Materiales y Métodos

6.1. Cultivos vegetales

6.1.1. Material vegetal

El fondo genético de las plantas usadas en este trabajo es *Arabidopsis thaliana* L. Heynh (*A. thaliana*), ecotipo Columbia-0 (Col-0) y ecotipo Landsberg erecta (Ler).

Las líneas *amiRNA JAZ5/JAZ6* fueron generadas en el laboratorio del Prof. Micol y posteriormente se seleccionaron en el laboratorio las líneas homocigotas F2 que presentaban reprimidos ambos genes.

Las líneas de reducción de función ARNi *NINJA* fueron generadas en el laboratorio del Prf. Goossens.

Las líneas de sobreexpresión *35S:NINJA::GFP*, *35S:JAZ5::GFP*, *35S:JAZ6::GFP* fueron generadas en el ecotipo Col-0 y fueron seleccionadas las líneas homocigotas que presentaban una sola inserción para cada gen indicado.

Además se han empleado los mutantes *jin1-2* descrito con anterioridad en Lorenzo y col., 2004 y generado en nuestro laboratorio, *coil-1* donado por J. Turner, *tpl1-1* donado por J. Long, *coil-16*, *coil-30*, *jar1-1* y las líneas de sobreexpresión *35S:JAZ3::GFP* y *35S: JAZ3ΔC::GFP* (Chini y col., 2007), *TPL1::HA* (Szemenyei y col., 2008), *35S:COI1::FLAG* (Fonseca y col., 2009a), *35S:MYC2::GFP* (Chini y col., 2009), *35S:MYC3::HA* y *35S:MYC4::GFP* (Fernández-Calvo y col., 2011), las líneas de sobre-expresión generadas por el Dr. Andrea Chini de las versiones truncadas (*JAZΔJas*) de las proteínas JAZ 1, JAZ2, JAZ6 y JAZ12, fusionadas al epítipo HA. Se han empleado así mismo, células en suspensión de *Arabidopsis* (PSB-D) en los experimentos de purificación en tándem de proteínas.

6.1.2. Condiciones de crecimiento de *Arabidopsis*

6.1.2.1. *In vitro*

Las plantas fueron crecidas en condiciones *in vitro* en medio Johnson al 0,7% de agar suplementado con sacarosa al 1% (Lorenzo y col., 2003).

Las semillas, después de ser esterilizadas con una solución de lejía y ácido clorhídrico (1:0,6) se crecieron en cámara de cultivo a una temperatura de 22°C y 60% de humedad

y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. En el caso de experimentos para testar la sensibilidad frente a hormonas se suplementó el medio con la concentración de hormona adecuada a cada tratamiento, ácido jasmónico (JA) desde 1 a 100 μ M, coronatina (COR) 0,1, 0,5 o 1 μ M (Sigma-Aldrich, www.sigmaaldrich.com). Las semillas de *coi1-1* usadas tanto en ensayos *in vitro* como en tierra, por tratarse de un mutante estéril que ha de mantenerse en heterocigosis, fueron seleccionadas *in vitro* en presencia de JA 50 μ M.

6.1.2.1. En sustrato

Los ensayos en sustrato se realizaron en macetas con mezcla de tierra y vermiculita (3:1) y se cultivaron en el invernadero o en cámaras climáticas a una temperatura de 22° C, una humedad relativa del 60% y bajo un fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad.

6.1.3. Cruzamientos en *Arabidopsis*

Las plantas de *Arabidopsis* se cruzaron emasculando las flores receptoras antes de que maduraran sus anteras y frotando su estigma con uno o varios estambres maduros de las plantas polinizadoras. Los frutos resultantes se recogieron individualmente y en su descendencia se analizó la segregación.

6.1.4. Transformación de *Arabidopsis*

La transformación de *Arabidopsis* se realizó a través de las inflorescencias de plantas cultivadas en tierra durante 5 semanas en el momento en el que presentaban el mayor número posible de botones florales. Se utilizó el método de infiltración por vacío con una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) portadora de la construcción de interés en medio 0,5X MS suplementado con sacarosa (5%), BAP (11 ng/mL) y agente surfactante Silwet L-77 (0,02%) (Clough y Bent, 1998). Se seleccionaron plántulas resistentes a los antibióticos correspondientes y se propagó la progenie F2 para su posterior análisis.

6.1.5. Análisis fenotípico de plántulas de Arabidopsis

Para los ensayos de inhibición del crecimiento de la raíz y extracción y cuantificación de antocianinas (Swain y Hillis 1959), se usaron plántulas de Arabidopsis Col-0, Ler, plantas transgénicas de sobre-expresión o RNAi de NINJA, *tpl-1*, plantas transgénicas que expresan 35S:JAZ5::GFP y 35S:JAZ6::GFP crecidas durante 9 días en medio Johnson con concentraciones crecientes de JA o COR.

6.1.5.1. Ensayos de inhibición del crecimiento de la raíz

Se midieron las raíces tras 9 días de germinación en placas horizontales. Se llevaron a cabo tres ensayos independientes para cada muestra, y en cada ensayo se usaron de 20 a 30 plántulas. Los valores se representan como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza por el método de la *t* de Student.

6.1.5.2. Extracción y cuantificación de antocianinas

Se pesó el tejido fresco de la parte aérea de 12 plántulas de Arabidopsis. Se añadió 1,2 mL de la solución I (Cloruro de hidrógeno 0.5N, Metanol 80% v/v) y se dejó 24 horas en oscuridad. A continuación, se tomó la parte acuosa y se dividió a partes iguales en dos tubos, una para generar el control y otra para realizar la medida de antocianinas de cada muestra. A las muestras control se les añadió solución de blanqueo (agua oxigenada 30%, Cloruro de hidrógeno 3N, metanol 1:5) y a las muestras a analizar se les añadió la solución II (Cloruro de hidrógeno 3N, metanol 1:5), y cada una de ellas permanecieron en oscuridad durante 15 min. Finalmente, se midió la absorbancia de cada muestra a 530 nm. Para calcular el contenido de antocianinas se usó la siguiente fórmula.

Contenido antocianinas = A_{530} (muestra-control)/mg tejido fresco

Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado y el análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza por el método de la *t* de Student.

6.2. Plásmidos

Los plásmidos que se usaron para las distintas transformaciones fueron:

1. pDONR201, pDONR207 y pDONR221 (Invitrogen, www.invitrogen.com), con origen de replicación en *E. coli*.

2. pMAL-c2X, para la expresión de proteínas en bacteria, modificado previamente mediante la inserción de un *cassette* de clonaje Gateway en el MCS (New England Biolabs, www.neb.com).
3. Plásmidos binarios: pGWB5 y pGWB14 (Nakagawa y col., 2007).
4. Plásmidos para levaduras pGADT7, pGBKT7, pGAD24 y pGBT9, modificados mediante la inserción de un *cassette* de clonaje Gateway en el MCS (Clontech, www.clontech.com).
5. Plásmidos para experimentos de purificación en tándem de proteínas, pKCTAP (con las correspondientes colas en el extremo C-terminal de la proteína), y pKNGSTAP (fusión N-terminal) (Van Leene y col., 2008).

6.3. Ensayos microbiológicos

6.3.1. Cultivos bacterianos

6.3.1.1. Cepas

La transformación y multiplicación de plásmidos se llevó a cabo en la cepa bacteriana DH5 α de *Escherichia coli* (*E.coli*) (Hanahan, 1983). Para la expresión de proteínas recombinantes se empleó la cepa BL21pLysS de *E.coli* (Novagen). La cepa C58C1 de *A. tumefaciens* fue empleada para realizar las transformaciones en plantas de *A. thaliana* (Deblaere y col., 1985).

6.3.1.2. Método de crecimiento

Para el crecimiento de las cepas bacterianas se utilizó el medio de cultivo LB (10 g de bactopectona, 10 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl hasta 1L de H₂O, pH 7.4), tanto líquido como sólido (Sambrook y col., 1989), con los requerimientos correspondientes según el caso. La temperatura de crecimiento fue de 37°C para *E. coli* y 28°C para *A. tumefaciens*. El crecimiento en medio líquido se realizó a 250 rpm y la medida del crecimiento a una DO600.

6.3.1.3. Transformación

6.3.1.3.1. *E.coli*

La transformación de células competentes de *E. coli* se llevó a cabo según se describe en Sambrook y col., (1989). Las células competentes se descongelaron durante 10 min y, a continuación, tras añadir el ADN de interés, se incubaron en hielo durante 20-30 min. Posteriormente, se sometieron a un choque térmico, de 90 segundos a 42° C, y se

pasaron a hielo, donde se mantuvieron durante 1-2 min. Seguidamente, se añadieron 0,8 mL de medio LB, y se incubaron alrededor de una hora a 37° C. Finalmente, se sembraron en medio LB, suplementado con los antibióticos necesarios, según el tipo de plásmido, para la selección de los transformantes y se incubaron toda la noche a 37° C.

6.3.1.3.2. *A.tumefaciens*

Para llevar a cabo la transformación de las células competentes de *Agrobacterium*, se descongeló una alícuota en hielo y a ésta se le añadieron 0,5-2 µg del plásmido de interés. A continuación, las células se mantuvieron 5 minutos a 37°C y, posteriormente, se pasaron a hielo durante 30 min. Tras añadir 1 mL de medio LB, las células se incubaron a 28° C, durante 4 hora en agitación, y se sembraron en placas con medio LB y los antibióticos de selección correspondientes, incubándose las placas durante 2 días a 28° C.

6.3.2. Cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

6.3.2.1. Cepas

En este trabajo se usaron las cepas de *S. cerevisiae* AH109 (James y col., 1996) y la Y187.

6.3.2.2. Métodos de cultivo

Las células competentes y transformación de *S. cerevisiae* con ADN plasmídico se realizó según el protocolo de Clontech (Yeast Protocols Handbook) con las variaciones descritas en Chini y col., 2009.

Los cultivos de levadura se crecieron en medio rico YPD o en medio selectivo mínimo YSD (Clontech) con los suplementos adecuados para mantener la selección de los plásmidos (Rose, 1990). Los medios selectivos de crecimiento, se basan en el hecho de que las cepas usadas son incapaces de crecer sin los aminoácidos triptófano (Trp), leucina (Leu), histidina (His) y adenina (Ade), a menos que hayan sido transformadas previamente con los plásmidos adecuados (que les permite sintetizar W y L), o que las proteínas híbridas codificadas por ambos plásmidos interactúen entre sí (entonces se reconstituye el FT Gal4 y se expresan los genes reportadores necesarios para la síntesis de H y Ad). La temperatura de crecimiento fue de 30° C. Los cultivos se crecieron en

medio líquido con agitación continua en un agitador orbital a 250 r.p.m. Los medios sólidos se prepararon con agar al 1,5% (p/v).

6.4. Manipulación de ácidos nucleicos

6.4.1. ADN

6.4.1.1. Purificación de ADN plasmídico

6.4.1.1.1. *E.coli*

Para el aislamiento a pequeña escala de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* se utilizó el kit de extracción *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.4.1.1.2. *S. cerevisiae*

Para el aislamiento a pequeña escala de ADN plasmídico a partir de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó el kit de extracción *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante, con las siguientes modificaciones. Se partió de un cultivo de 20 mililitros crecido hasta condiciones de saturación a 30°C y en agitación. A continuación se centrifugó, y el sedimento se homogenizó con buffer de resuspensión (Promega) con bolas de vidrio (Sigma), y seguidamente se realizaron 3 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido. A continuación, se siguió con el protocolo estándar de kit *Minipreps DNA purification System* (Promega).

6.4.1.2. Purificación de ADN genómico total

El ADN de *Arabidopsis* se aisló según el método de Doyle y Doyle (1990). Para ello, se homogeneizó el tejido previamente congelado en N₂ líquido y se añadieron 500 µL de tampón de extracción de ADN (1,4M cloruro de sodio, 20 mM EDTA, 100 mM Tris pH 8, 3% CTAB, 1% β-mercaptoetanol). Las muestras se homogenizaron durante 5 segundos más. A continuación, se incubaron a 65°C durante 30 minutos y después se centrifugó durante 10 minutos a 16000 g, se transfirió el sobrenadante a otro vial al que se le añadió el mismo volumen de isopropanol y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Seguidamente, se centrifugó 10 minutos a 16000 g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 50 µL de agua. La concentración se estimó mediante espectrofotometría (Sambrook y col., 1989).

6.4.1.3. Amplificación y purificación de ADN

La amplificación de fragmentos de ADN se realizó mediante PCR (Sambrook y col., 1989).

Para ello se utilizó la polimerasa termoestable *Taq* (Roche) siguiendo las especificaciones del fabricante, y usando los oligonucleótidos necesarios en cada caso.

La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó según *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, www.qiagen.com) o *High Pure PCR Product Purification Kit* y *High Pure PCR Cleanup MicroKit* (ambos de Roche, www.roche.com). En todos los casos el ADN se cuantificó tanto en gel de agarosa como por espectrofotometría (Nanodrop, www.nanodrop.com).

Para la separación de fragmentos de ADN se utilizaron geles horizontales de agarosa (0,8-2,5%) con bromuro de etidio (0,4 µg/mL) en tampón TE (Tris 50 mM, EDTA 1mM) y se resolvieron a 80-100 V.

6.4.1.4. Tratamiento enzimático del ADN

La manipulación enzimática del ADN con enzimas de restricción u otras enzimas modificadoras se hizo atendiendo las especificaciones del proveedor de la enzima y según protocolos ya establecidos (Sambrook y col., 1989). El tiempo de digestión empleado dependió de la enzima utilizada y de la cantidad y pureza del ADN tratado. El fragmento klenow de la ADN polimerasa (Promega) de *E.coli* se usó para rellenar extremos 3' protuberantes dejándolos romos. La fosfatasa alcalina (Promega) se utilizó en algunos casos para eliminar los grupos fosfato 5' de los vectores linearizados en los que se clonaron los distintos insertos. Las ligaciones se realizaron con ADN ligasa del fago T4 (Promega), con una relación molar, aproximada, entre vector e inserto de 1:3. Las reacciones de ligación se mantuvieron durante toda la noche a 16°C para unir extremos romos y durante 1 hora a temperatura ambiente para unir extremos cohesivos. Una vez acabadas las reacciones enzimáticas, las enzimas se inactivaron incubando 10 min a 70° C, o se retiraron de la reacción mediante extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). En éste último caso, el ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol y 1/10 de acetato sódico 3M pH 5.

6.4.1.5. Determinación de la secuencia del ADN

La determinación de las secuencias de ADN se realizó por secuenciación automática (Secugen). En todos los casos se suministró al servicio de secuenciación fragmentos, bien de PCR o bien plásmidos, limpios de enzimas y de nucleótidos mediante elución con la resina QIAEX II (Qiagen) o mediante extracción con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico y posterior precipitación.

6.4.1.6. Análisis de secuencias de ADN

Las secuencias determinadas se analizaron mediante el programa CRHOMAS. La búsqueda de secuencias homólogas se realizó con el programa BLAST (Altschul y col., 1990) y el método *GenQuiz* (Scharf y col., 1994). El alineamiento se realizó con *ClustalW* y los árboles genéticos correspondientes fueron realizados con *TreeView* 1.6.6. Para el análisis de las secuencias que codifican las proteínas que interaccionaron con JAZ3 en los ensayos de doble híbrido en levaduras se usó BLAST.

6.4.1.7. Análisis de promotores y secuencias

Para la identificación de secuencias estadísticamente sobre-representadas en los promotores de los genes de la familia JAZ se usaron los programas *Motif Analysis* (TAIR) y *Motif Sampler* (Thijs y col., 2001).

Para el análisis de las secuencias que codifican las proteínas que interaccionaron con JAZ3 en los ensayos de doble híbrido en levaduras se usó BLAST y *WClustal*.

6.4.2. ARN

6.4.2.1 Purificación de ARN total

Para la extracción de ARN de hoja se siguió el procedimiento descrito por Logemann y col. (1987). Se homogenizó el tejido vegetal en frío con bolas de vidrio (Sigma) hasta obtener un polvo fino, se añadieron 900 µL de Trizol y se continuó la homogenización hasta la disgregación completa del tejido. A continuación, se añadieron 180 µL de cloroformo y se agitó vigorosamente. Seguidamente, se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 11000 r.p.m., y se transfirió la fase acuosa a otro tubo. Se añadieron 500 µL de isopropanol, se mezcló bien y se dejó precipitando a 4°C al menos una hora. Tras la precipitación, se centrifugó 10 minutos a 4°C a 11000 r.p.m., se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 900 µL de etanol al 75%. Finalmente, se dejó

que se evaporase el exceso de etanol y se resuspendió el precipitado en 40 µL de agua ultra pura tratada con DEPC. Se incubaron las muestras 10 minutos a 65°C, se dejaron una hora a 4°C, se centrifugaron 10 minutos a 11000 r.p.m., y se recogió cuidadosamente el sobrenadante. El ARN se cuantificó mediante espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm.

6.4.2.2. Hibridación tipo *northern*

Para la detección de moléculas específicas de ARN mediante hibridación de tipo *northern* se llevaron a cabo electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1,5% en presencia de formaldehído/formamida en tampón 1X MEN (Logemann y col., 1987). Las muestras de ARN (10 µg) se cargaron con bromuro de etidio con el fin de visualizarlas por fluorescencia y así comprobar su integridad. Posteriormente, el ARN se transfirió a membranas de nylon Hybond XL (Amersham) por métodos convencionales (Sambrook y col, 1989). Las membranas se fijaron en un horno *crosslinker* UV de Amersham. Los filtros se hibridaron a una temperatura de 65°C con una sonda radiactiva en tampón fosfato 0,5 M pH 7.0, EDTA 1 mM pH 8 y SDS al 7% (Church y Gilbert, 1984) durante 16 horas. Los lavados se realizaron a una temperatura de 65°C en 3X SSC con SDS 0,5% (1X SSC: NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM). Las membranas se escanearon usando *Phosphorimager*, y las imágenes obtenidas se cuantificaron y analizaron usando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

6.4.2.3. Síntesis de sondas radiactivas

Para marcar radiactivamente sondas de ADN se ha seguido el método de cebadores de secuencia al azar o *random primer*, desarrollado por Feinberg y Volgelstein (1983). Este método se basa en la capacidad de la ADN polimerasa de sintetizar una nueva cadena de ADN complementaria a la cadena molde. Se siguió el procedimiento descrito en el manual suministrado por el kit de marcaje *Rediprime* (Amersham). Para ello, se utilizaron 40 ng de ADN. Como nucleótido marcado se utilizó el α -³²P-dCTP (50 µCi) de Amersham Pharmacia Biotech.

6.4.2.4. RT-PCR cuantitativa

Los experimentos de RT-PCR cuantitativa fueron realizados con ARN extraído a partir de plantas de *Arabidopsis* de 6 semanas. La extracción de ARN se realizó con el

reactivo *Trizol* (Invitrogen) en combinación con las columnas para limpieza de ácidos nucleicos *RNeasy mini kit* y el enzima *DNase I* (ambos de Qiagen). Así se obtuvo un ARN de alta calidad y sin contaminación de ADN genómico para posteriores análisis. El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado a partir de 0,5-1 µg de ARN total con *High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). El ADNc de cada muestra se diluyó 10 veces y 5 µl de esta dilución se emplearon para amplificar los genes específicos y el gen de control interno *ACTINA8* usando el agente intercalante *Power SYBR Green* (Applied Biosystems). La PCR cuantitativa se hizo en placas de 96 pocillos adaptadas para lectura óptica en el termociclador *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de 50°C 120 segundos y 95°C 10 min y 40 ciclos de 95°C 15 segundos y 60°C 60 segundos. El análisis de datos que se muestra se hizo usando tres replicados técnicos de una muestra biológica (los resultados se confirmaron con otras replicas biológicos).

6.5. Análisis transcriptómico mediante hibridación con *microarrays*

Para la hibridación de los *microarrays* se utilizaron plántulas de 8 días post-germinación tratadas con JA a concentración 50 µM y un tiempo de incubación indicado para cada caso. Los ARNs se extrajeron con reactivo *Trizol* (Invitrogen) y se purificaron con columnas *RNeasy minikit* (Qiagen) según instrucciones del fabricante. El ARN total (1 µg de cada muestra) se amplificó y para permitir el posterior marcaje con fluoróforos se le incorporó aminoalil-UTP (*aa-dUTP*, Ambion) usando el kit *MessageAmp™ II aRNA kit* (Ambion). Posteriormente, 3,5 µg de cada muestra fueron solubilizados en Na₂CO₃ (0,1 M, pH 9.0) y conjugados con los fluoróforos Cy3 o *Hyper 5 Mono NHS Ester* (*CyTMDye Post-labelling Reactive Dye Pack*, Amersham). Las muestras fueron luego purificadas con *Megaclear™* (Ambion) según instrucciones del fabricante. La incorporación de los fluoróforos al ácido nucleico se midió en un espectrofotómetro de tipo Nanodrop (Nanodrop Technologies Inc.). La preparación e hibridación de las sondas se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del manual *Two-Color Microarray Based Gene Expression Analysis Manual* Ver. 5.7, Agilent Technologies. Para cada hibridación 825 ng de sondas marcadas con Cy3 e Hyper 5 se mezclaron y se añadieron a una solución que contenía a 11 µl de agente bloqueante 10x y 2,2 µl de tampón de fragmentación 25x en 55 µl de volumen final de agua libre de nucleasas. La mezcla se

incubó a 60°C durante 30 minutos para fragmentar el RNA y se paró la reacción con tampón de hibridación 2x. Las muestras se pusieron en hielo e inmediatamente se cargaron en los *arrays* que se hibridaron a 65°C durante 17 horas y se lavaron una vez en tampón de lavado GE 1 a temperatura ambiente (1 minuto) y una vez en tampón de lavado GE 2 a 37°C (1 minuto). Los *arrays* se secaron mediante centrifugación a 2000rpm durante 2 minutos. Los cristales usados fueron *Agilent Arabidopsis Oligo Microarrays 4x44K* (ref. 021169). Las imágenes de los canales Cy3 e Hyper5 fueron equilibradas y capturadas con un escáner GenePix 4000B (Axon) y la cuantificación de las intensidades de los spots se llevó a cabo con el software GenPix (Axon).

Los cambios de expresión para cada sonda se analizaron estadísticamente utilizando el método *RankProduct* (Breitling y col., 2004). Este método establece un orden en función de la intensidad de cada punto en el conjunto del *microarray* y hace un análisis estadístico con un p-valor con objeto de comprobar si los valores de cada punto reflejan una expresión diferencial de los genes. Los valores P (<0,05%) se corrigieron usando el método descrito por Benjamini y Hochberg (1995) para controlar la tasa de falsos positivos (FDR). Para la visualización y evaluación de los datos obtenidos se empleó el programa FIESTA <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>.

Las hibridaciones de los *arrays* y el análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo en el Servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (Breitling y col., 2004; Smyth, 2004).

6.6. Generación de plantas transgénicas

Para generar plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobre-expresan las proteínas NINJA, JAZ5 y JAZ6 en el fondo genético Col-0, en primer lugar se amplificó la secuencia codificante de NINJA usando el kit *Expand High Fidelity polymerase* (Roche) con oligos compatibles con el sistema Gateway (tabla 7). El producto de PCR fue clonado en el vector pDONR207 usando el kit Gateway BP II (Invitrogen) y secuenciado para verificar que la secuencia estuviese en el marco correcto de lectura. Este plásmido se usó para generar la construcción de la proteína correspondiente mediante clonaje en el vector de destino pGWB5 (Mita et al., 1995), para lo cual se usó el kit *Gateway LR II* (Invitrogen). Esta construcción fue transformada en la cepa C58C1 de *A. tumefaciens* usando el método de choque térmico y transformada por el método de inmersión floral

(Clough and Bent, 1998) en plantas de *Arabidopsis* Col-0. Se seleccionaron plántulas resistentes a los antibióticos correspondientes y se propagó la progenie T2 para su posterior análisis.

6.7. Análisis de proteínas

6.7.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Las secuencias codificantes completas así como las versiones truncadas de las distintas proteínas empleadas fueron amplificadas mediante PCR usando como molde o bien los plásmidos obtenidos de TAIR que se muestran en la tabla 1 o bien ADNc, manteniendo el marco de lectura y el codon stop. Se usó para ello el kit *Expand High Fidelity polymerase* (Roche) con oligos compatibles con el sistema Gateway (tabla 7). Los fragmentos amplificados fueron clonados usando el sistema Gateway (Invitrogen) en los vectores pDONR201/pDONR207 y recombinado en el vector de destino pDEST-TH1 (Hammarstrom et al., 2002). Se obtuvieron así fusiones con la MBP en posición amino terminal. Todas las construcciones fueron secuenciadas antes de expresar las proteínas.

Las proteínas recombinantes fueron expresadas en la cepa BL21 de *Escherichia coli* de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante (Sistema de purificación pMAL, New England Biolabs). Las bacterias transformantes fueron crecidas en medio solido LB suplementado con antibióticos (Cloranfenicol y Ampicilina). Se creció un pre-cultivo a partir de colonia única con el que se inoculó 200 mL de LB suplementado con los antibióticos, se creció en agitación orbital a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. La inducción de la proteína se llevó a cabo con IPTG 1uM a temperatura ambiente y en agitación orbital ajustando el tiempo óptimo para cada una de las proteínas. Se centrifugó el cultivo a 6000 r.p.m durante 15 min y se congeló el sedimento a -80°C durante toda la noche. Las muestras fueron resuspendidas en tampón de ruptura (20 mM Tris pH 7,4, 200 mM cloruro de sodio, 1mM EDTA, PMSF 1 mM) , sonicadas y centrifugadas. Para purificar la proteína, el sobrenadante se incubó en columnas de amilosa (New England Biolabs, <http://www.neb.com>), durante 3 horas en agitación a 4°C. Se eluyó el sobrenadante y se lavó la resina que retiene la proteína con tampón de ruptura tres veces.

Para ensayos de *pull-down* (PD) la pureza, estabilidad y concentración de las proteínas se evaluó por comparación con concentraciones conocidas de BSA mediante geles PAGE SDS teñidos con Coomassie.

Para ensayos de retardo en gel las proteínas se eluyeron de la columna usando tampón de ruptura suplementado con maltosa 10mM.

Las proteínas expresadas se resumen en la tabla 6 que se muestra a continuación.

gen	Atg	Referencia
<i>JAZ1</i>	At1g19180	Chini et al., 2007
<i>JAZ2</i>	At1g74950	Clon ABRC U15521
<i>JAZ3</i>	At3g17860	Chini et al., 2007
<i>JAZ4</i>	At1g48500	Clon ABRC pENTR221
<i>JAZ5</i>	At1g17380	ADNc
<i>JAZ6</i>	At1g72450	Clon ABRC U10117
<i>JAZ7</i>	At2g34600	Clon ABRC S63131
<i>JAZ8</i>	At1g30135	Clon ABRC U84620
<i>JAZ9</i>	At1g70700	Chini et al., 2007
<i>JAZ10</i>	At5g13220	Clon ABRC U14329
<i>JAZ11</i>	At3g43440	Clon ABRC S68219
<i>JAZ12</i>	At5g20900	Clon ABRC U09134
<i>JAZ3AC</i>	At3g17860	Chini et al., 2007
<i>JAZ3AN</i>	At3g17860	Chini et al., 2007
<i>NINJA</i>	At4g28910	ADNc
<i>MYC2</i>	At1g32640	Clon ABRC CD274297
<i>COI1</i>	At2g39240	Clon ABRC CD257277
<i>HDA6</i>	At5g63110	Clon ABRC CD255749

Tabla 6. Resumen de proteínas recombinantes usadas.

6.7.2. Ensayos de *Pull-Down* (PD)

Para generar los extractos proteicos se crecieron plántulas de *Arabidopsis* durante diez días en medio Johnson. Dichas plántulas silvestres o que expresaban *35S:COI1::FLAG*, *35S:MYC2::GFP*, *35S:MYC3::HA*, *35S:MYC4::GFP*, *35S:NINJA::GFP*, *35S:TOPELESS::HA*, *35S:JAZ5::GFP* y *35S:JAZ6::GFP* fueron maceradas en nitrógeno líquido y homogenizadas en tampón de extracción (50mM Tris-HCl pH 7,4, 80mM NaCl, 10% glicerol, 0.1% Tween 20, 1mM DTT, 1mM PMSF, inhibidor de proteasoma MG132 (50µM; Sigma), cóctel de inhibidores de proteasas (Roche). Se centrifugaron

(16,000g a 4 °C) y se recogió el sobrenadante. Para los experimentos de PD *in vivo* se usaron 6ug de resina que contiene la proteína específica recombinante fusionada a MBP a la que se añadió extracto con 1 mg de proteína total, y se incubaron 1 hora a 4°C. Se lavaron con tampón de extracción dos minutos en noria a 4°C tres veces. Después de los lavados, las muestras fueron digeridas con 1 µl de factor Xa (New England Biolabs) y desnaturalizadas a 95°C durante 5 minutos para su posterior análisis mediante ensayos de Western Blot. Se usaron los anticuerpos anti-HA peroxidada (Roche) o anti-GFP peroxidada (Milteny biotec). Para confirmar el control de carga de las proteínas recombinantes usadas se cargaron 5uL de cada muestra en un gel de SDS PAGE, que fue teñido con Azul de Coomassie. Para ello se sumergió el gel en una solución de metanol 40%, acético 10% y azul de Coomassie R-250 0,1% durante 1h en agitación. El gel se decolora con una solución de etanol 40%, metanol 30% y acético 10% en agitación durante toda la noche. Posteriormente se seca en el secador de geles con vacío a 65° C durante 1h.

6.7.3. Ensayos de Western Blot (WB)

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 8-12% dependiendo del tamaño de la proteína a analizar (SDS-PAGE). Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de ECL-nitrocelulosa (Bio-rad) e incubadas posteriormente con los anticuerpos correspondientes. Un anticuerpo conjugado con peroxidasa fue utilizado para detectar las proteínas reconocidas por los anticuerpos primarios por quimio-luminescencia (Amersham Biosciences, Inc.).

6.7.4. Ensayos de degradación de proteínas *in vitro*

La región codificante de la proteína JAZ3 estaba clonada en el plásmido pUNI bajo el promotor T3. Este plásmido se usó como molde para expresar JAZ3 *in vitro* para lo que se empleó el kit *TnT coupled wheat germ extract system* (Promega). Las secuencias codificantes de las proteínas JAZ3ΔC (1-299aa), JAZ1 y JAZ9 fueron amplificadas por PCR, manteniendo el marco de lectura y el codon stop, y se expresaron *in vitro* usando el kit TnT T7 Quick for pcr DNA (Promega). Las construcciones se verificaron por secuenciación antes de expresar las proteínas.

Estas proteínas se marcaron con metionina ³⁵S (GE Healthcare). Para la preparación de los distintos extractos de proteínas, se usaron plántulas de diez días de *Arabidopsis* Col-0, *coil-16*, *jai3-1* y plántulas de líneas transgénicas *35S:NINJA-GFP*. Dichos extractos fueron pre-tratados durante 16 horas con JA (50uM, Sigma) y/o inhibidor de proteasoma MG132 (50uM, Sigma) o DMSO/DMF como control, según se indica. Estas plántulas fueron maceradas en nitrógeno líquido, resuspendidas en tampón de extracción (20mM TrisHCl pH 7, 25mM NaCl, 0.01%NP-40, cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma)), sonicadas, y centrifugadas. La concentración de proteínas se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para el ensayo de degradación se usó 100ug de proteína total, que se añadió junto con la proteína marcada con ³⁵S al tampón de degradación (50mM TrisHCl pH 7, 5mM MgCl₂, 5mM ATP y 50µg/µL ubiquitina). Las muestras se preincubaron a temperatura ambiente durante dos horas con JA (50µM; Sigma) y/o MG132 (200µM; Sigma) o DMSO/DMF como control, según se indica. El ensayo de degradación se realizó incubando las muestras a 30°C a diferentes tiempos (de 0 a 240 minutos) en presencia de cóctel de inhibidor de proteasas (Sigma). La reacción se paró poniendo las muestras a 4°C y añadiendo buffer de carga 5x (Tris HCl Ph 6,8, SDS, glicerol, beta-mercaptoetanol, azul de bromofenol). Se hirvieron a 95°C y se cargaron en geles de SDS. Los geles se escanearon usando Phosphorimager, y las imágenes obtenidas se cuantificaron y analizaron usando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

6.7.5. Ensayos de unión de proteínas a ADN y retardo en gel (EMSA)

La secuencia codificante de MYC2 se amplificó por PCR, fue clonada en los vectores pDONR201/pDONR207 y recombinada en pDEST-TH1 para obtener la proteína fusionada a MBP en la región amino terminal (sistema Gateway® (Invitrogen)). La construcción se verificó por secuenciación antes de expresar la proteína recombinante en células de *E. coli* de la cepa BL21. MYC2-MBP se purificó mediante columnas con resina de Amilosa (New England Biolabs) siguiendo los protocolos Standard.

La sondas con el fragmento del promotor de JAZ3 que contiene las cajas G o T/G silvestres o sus versiones mutantes, se sintetizaron por PCR con oligos marcados o no con biotina en el extremo 5' (tabla 8, a y b).

a

Fragmento del promotor JAI3/JAZ3	
caja G	5'-GAAACGCCACACACTGCACGACGATG CACGT GCCTTTTAAACCGACTATATCCGGTG-3'
caja G mutante	5'-GAAACGCCACACACTGCACGACGATA TGACCT TCTTTTAAACCGACTATATCCGGTG-3'
caja T/G	5'-GAAACGCCACACACTGCACGACGATA TGACCT TCTTTTAAACCGACTATATCCGGTG-3'
cajaT/G mutante	5'-GAAATTGCGGTAAATTAACCTCATT TGACTA TTTTCATTTTCTCCCTCAAAGCCTC-3'

b

Oligos amplificación sonda		
G box	F	5'-GAAACGCCACACACT-3'
	R	5'-CACCGGATATAGTCG-3'
T/G box	F	5'-GAAATTGCGGTGAAT-3'
	R	5'-GAGACTTTTGAGGGA-3'

c

<p>Promotor de <i>JAZ3</i></p> <p>GAGTGATTTTAGTAATATGTACATTAAAGTAATATTTCTTTTTGGTACCAATAATTACCTTAATTAATA CAAGTATAGTTTAAAGCAACAAGCAACATTCTTTAATAATTCGCGAAAAATATTAATAAAAGTACAATGA CAGAAAAAATAATTAATAAATTGGATTAAAAAATAATATTAGAGTGATGACATAATCAGATGAGGAT TTAGATTTAGCTTAATAATGTTTAGTTGTGGAACATAATTTCCGCAACAATTATTTTGTGTATTTAAAT CATTTTATGAAAGTCTAATCTTTACAATTACTTTATAGTACCATCCGATTAATCAAAGATTAAAAATATA GTACTAAAATACAAATTAATATATTTTGCCAAAAAATGCAACGTGCAAATGTTTATCTTGGTCAAGAG AACGTGCACGAAAGTAGTGTAACATAATTTTACTATTTTAGATTGAGCGGTGAGACAAAAAGGGGTTA GACTCACGCGCTACACTTAGCGCGTCAGCCGACAAAAAAGTGTTGTCATTGAATAAAAAAATAAAT TAAAACTGCCGCTTCGCATCTCGTGAATCATTCACGTTAAAAATAGCGCACGTGCCTCGCCACGCGTCTC ACCACAAAAAGAAACGCCACACACTGCACGACGATGCACGTGCCTTTTAAACCGACTATATCCGGT GACGTAACCGGGACAACCTGTAGCTGGTTTTTCGCCAATAGGATATGAGAAAAAGAATCTTTTTTTT CTTGTTATAGTTATAAATTAATGGTACGATTACATGTGCGATGCGATTTGTTAATAAACTAGAAATT GCGGTGAATTAACCTCATTCACGTTTTTTTCTCCCTCAAAGTCTCTGTTTTTTTCTTTTTT CCGGCGAAGCTCTATTTAGCTTGATTCCGGCGTTTAAACACGCGTTTAAATCGAAACAGACATTGAGAT CGAATTAATTTGTAGCGGGCTGTGCTTTATTATAGATG</p>

Tabla 8. Promotor JAZ3 y sondas usadas para el ensayo de retardo en gel. a. Fragmento del promotor de *JAZ3* que se usó para generar la sonda del ensayo de retardo. **b.** Oligos que se utilizaron para amplificar la sonda con el fragmento del promotor de *JAZ3*. Se marcaron con biotina en el extremo 5' cuando fue requerida la sonda marcada. **c.** Promotor de *JAZ3*. El fragmento marcado en negrita fue el que se seleccionó para generar las distintas sondas. En rojo están señaladas las cajas G y en azul las cajas T/G. En amarillo está señalado el codon de inicio de la transcripción.

Para detectar el complejo MYC-sonda se utilizó el kit *Lightshift Chemiluminescent EMSA* (Pierce). Se incubó MYC2 (2ug) con la sonda biotinilada (30 fmoles) durante 40 minutos en tampón de unión (10 mM Tris at pH7.5, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 10mM MgCl₂, 75 ng de poly(dI·dC)). La especificidad de MYC por la sonda se determinó mediante ensayos de competición, añadiendo a la reacción cantidades crecientes de

sonda silvestre o mutante, no marcada con biotina (1X, 3X y 10X). El producto de la reacción de unión se cargó en geles de poliacrilamida al 4% y se transfirió a membranas de nylon (Pierce). Para la detección de la unión se usó el kit *Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module* (Pierce).

6.7.6. Purificación en tándem de complejos proteicos: TAP-tagging

Se clonaron de las secuencias codificantes de los genes *JAZ3*, *JAZ5* y *JAZ7* en el vector de destino Gateway pKCTAP y se transformaron en cultivos celulares en suspensión de *Arabidopsis* como se describe en Van Leene et al., 2007. Los complejos proteicos se generaron usando la técnica de GS tag (Burckstummer et al., 2006), y posteriormente se llevó a cabo la precipitación y separación proteica, de acuerdo con los protocolos empleados en Van Leene et al. (2008). Los fragmentos peptídicos fueron analizados con el analizador 4800 Plus MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) y las proteínas correspondientes fueron identificadas mediante las bases de datos de comparación de proteínas por homología de secuencia (TAIR) (Van Leene et al., 2010). La purificación e identificación de péptidos se llevó a cabo en el laboratorio de Dr. Geert de Jaeger (VIB, Gante).

6.7.8. Expresión transitoria en *N. benthamiana* y co-inmunoprecipitación.

Se infiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con cultivos de *Agrobacterium* transformados con las construcciones adecuadas para expresar las proteínas JAZ3::GFP, JAZ3ΔC::GFP y JAZ3ΔC::GUS. Los cultivos de *A. tumefaciens* cepa C58C1 se crecieron a 28°C en agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ = 0,6. Entonces, fueron centrifugados y el sedimento fue resuspendido en MgCl₂ a concentración 10 mM. Esta solución fue infiltrada en el envés de hojas de plantas de *N. benthamiana* de 4 semanas de edad mediante una jeringa estéril de 1 ml de volumen. Se infiltraron un total de 3 hojas por planta (3 plantas para cada combinación de proteínas) y las plantas se mantuvieron en ciclos de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 21°C durante dos días hasta su posterior análisis por microscopía.

6.8. Ensayos de dos híbridos en levaduras

Los experimentos de dos híbridos en levadura (Fields and Song (1989)) se efectuaron utilizando el sistema *Matchmaker Gal4 Yeast Two-Hybrid System-3* (Clontech) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

El sistema de doble híbrido permite identificar interacciones *in vivo* entre dos proteínas (X e Y) mediante la reconstrucción de un FT activo. El FT activo es un dímero, formado por la proteína de interés (cebo) fusionada a un dominio de unión a DNA (*Binding Domain* (BD), (X-BD), y otra proteína fusionada al dominio de activación (*Activation Domain* (AD); Y-AD) llamada proteína diana o presa. La interacción entre ambas proteínas reconstruye un FT activo que transcribirá un gen reportero, en este caso lac-Z, gen de la beta-galactosidasa, cuya expresión permite identificar los clones positivos mediante un ensayo de actividad basado en la hidrólisis del X-Gal.

6.8.1. Cribado en levaduras

La secuencia codificante de JAZ3 fue ampliada con el sistema *Expand High Fidelity PCR system* (Roche) a partir de un plásmido pUNI proporcionado por TAIR. El producto de PCR fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *PstI* y clonado en el vector pGBKT7 previamente linealizado con dichas enzimas (Gal4 DNA-Binding Domain; BD) (Clontech). La construcción pGBKT7-JAZ3 que se usó como cebo se verificó por secuenciación antes de expresar la proteína y se transformó en la cepa Y187 (*MAT α*) de *S. cerevisiae*. La genoteca de cDNA que se usó como presa fue obtenida a partir de plántulas de *Arabidopsis* crecidas durante doce días en un medio que carecía de fosfato; fue clonada en el vector pGADT7 (Gal4 Activation Domain; AD) (Clontech) y se transformó en la cepa Δ H109 (*MAT α*) de *S. cerevisiae* según los protocolos de *BD Matchmaker Library Construction* (versión PR32047; Clontech; M. I. Puga *et al.*, no publicado). Esta librería fue cedida por el laboratorio del Prof. Paz-Ares del CNB. Se hizo *mating* entre las dos cepas de levaduras transformadas con los plásmidos correspondientes, cebo (Y187) y presa (AH109). Para ello se crecieron 50mL de la cepa AH109 con 500 μ L de la cepa Y187 en medio rico 2 \times YPDA (YPD suplementado con Adenina) a 30°C durante toda la noche. Las células diploides de levaduras fueron seleccionadas sembrándolas en medio mínimo SD que carecía de histidina (His), leucina (Leu), triptófano (Trp) y adenina (Ade), suplementado con 20 mM 3-aminotriazol (Sigma). Se encontraron 38 colonias que dieron positivo en el test de la β -galactosidasa que contenían posibles candidatos a ser interactores de JAZ3.

Se eligieron las colonias que dieron positivo en el test de la β -galactosidasa, se aislaron los plásmidos según los protocolos Standard, se transformó con ellos la cepa DH5 α de

E. Coli, se extrajo de nuevo el plásmido y se secuenció con los oligos ADISA o AD22C (tabla 7). Se verificaron mediante ensayos de doble híbrido en levaduras las interacciones proteína-proteína obtenidas en el cribado donde se usó como cebo JAZ3.

6.8.1.1. Ensayo de β -galactosidasa

Se crecieron las levaduras transformadas en una placa con medio mínimo YSD en ausencia de W y L. Posteriormente se añadieron 10mL de cloroformo y se dejó secar. Una vez seco se añadió el tampón con el sustrato X-gal (20mg/mL) (Sigma) y la reacción se llevó a cabo a oscuridad durante 24 horas.

6.8.2. Ensayos de doble híbrido en levaduras

Las regiones codificantes completas de todas las proteínas usadas en estos ensayos (JAZ1, JAZ2, JAZ3, JAZ4, JAZ5, JAZ6, JAZ7, JAZ8, JAZ9, JAZ10, JAZ11, JAZ12, COI1, MYC2, NINJA, PP1, PP2, TIFY8 y HDA6) así como las versiones truncadas de algunas de ellas (JAZ5.1, JAZ5.Z, JAZ5.J, JAZ6.1, JAZ6.Z, JAZ6.J, MYC2 Δ N, MYC2 Δ C, JAZ3 Δ C y JAZ3 Δ N), fueron amplificadas con el sistema *Expand High Fidelity PCR system* (Roche) usando los oligos correspondientes (tabla 7). Los productos de PCR fueron clonados en el vector pDONR207 usando el kit *Gateway BP II* (Invitrogen) y verificados mediante secuenciación. Estas construcciones se clonaron en los vectores de destino de alta expresión de copia pGADT7gateway (Gal4 AD) y pGBKT7gateway (Gal4 BD) y para ello se usó el sistema *Gateway LR reactions* (Invitrogen). Estas construcciones fueron verificadas mediante secuenciación.

La transformación de la levadura se llevó a cabo usando el protocolo del acetato de litio (Ito et al., 1983, Chini et al. 2009a). La cepa de levadura correspondiente se creció en YPD suplementado con adenina hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (D.O.600) entre 0,5 y 0,7. Tras centrifugar y lavar las células con agua, se resuspendieron en tampón TE-LiAc (acetato de litio 0,1 M pH 7,5, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A 100 μ L de las células en tampón TE-LiAc, se le adicionó 10 μ L de ADN de esperma de salmón (Sigma) como ADN vehículo, 250 ng de cada plásmido y 600 μ L de PEG-TE-LiAc (tampón TE-LiAc al que se le añade PEG al 40% (p/v)). Tras una incubación a 30° C durante 30 min, se efectuó un choque térmico a 42° C durante 15 min en presencia de DMSO al 10% (v/v). Después, se lavaron las células con agua estéril y se sembraron en las placas de SD en ausencia de Leu y Trp. Las células se

dejaron crecer a 30° C durante tres días. Las colonias positivas se crecieron en medio líquido selectivo en ausencia de Leu y Trp durante seis horas en agitación a 30°C, y se ajustó la densidad óptica a 3×10^7 células/mL (OD600 = 1). Para testar la interacción proteica, se sembraron 3 uL de muestra de cada resuspensión celular en placas con medio selectivo mínimo sin Adenina, Leucina, Histidina y Triptófano, suplementado con 5mM 3-aminotriazol. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 2-4 días. Como controles negativos se co-trasformaron el levaduras los vectores vacíos pGADT7 o pGBKT7.

6.9. Microscopía

6.9.1. Microscopía confocal para visualización de GFP

La GFP de las líneas transgénicas 35S:*JAZ3*-GFP y 35S:*NINJA*-GFP se visualizó en plántulas crecidas en medio Johnson mediante microscopia confocal a longitud de onda entre los 495 y los 610 nm (Leica). Las fotografías de las células de raíz que expresaban GFP se tomaron bajo luz UV (visualización de la proteína fluorescente) y luz visible (estructura de los tejidos de la raíz).

6.9.2. Microscopía óptica para visualización de GFP

Para la visualización de la GFP en las líneas transgénicas de 35S:*JAZ3*::GFP, 35S:*NINJA*::GFP, 35S:*JAZ5*::GFP y 35S:*JAZ6*::GFP se empleó el microscopio *Leica DMR UV/VIS* (www.leica.com) que con combinaciones de lámparas de luz UV y visible permite ver la fluorescencia de las construcciones fusionadas a la proteína GFP y analizar la estructura de los tejidos de la raíz.

6.10. Ensayos de expresión transitoria en protoplastos

Los ensayos de expresión transitoria se realizaron según los métodos que se describen en De Sutter y col. 2005 y Pauwels y col., 2008. Los protoplastos fueron preparados a partir de un cultivo celular Bright Yellow-2 tobacco y co-transfectados con un plásmido reportero que contiene el gen reportero de la Fluc bajo el promotor GAL4, una construcción normalizada que expresa la Renilla luciferasa (rLUC) bajo el promotor 35S y la construcción efectora. Las construcciones efectoras fueron clonadas usando el sistema Gateway LR cloning (Invitrogen) en el vector p2GW7. Alternativamente, el clonaje de MYC2 se llevó a cabo en el vector p2GAL4DBGW6. Para cada ensayo se usó 2 µg de cada tipo de plásmido. Seguidamente a la transfección, los protoplastos fueron incubados durante toda la noche, y posteriormente lisados. La actividad luciferasa, fLUC y rLUC, fue determinada con el sistema Dual-Luciferase reporter assay (Promega). Las variaciones en la transfección así como los errores técnicos fueron corregidos mediante normalización de la actividad fLUC por rLUC. Para realizar el análisis estadístico se usó el procesamiento por el Modelo general lineal de SAS (V.9.2). Se usó el método Dunnett para realizar las comparaciones múltiples entre los distintos grupos de datos.

6.11. Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos empleados para secuenciar y clonar se obtuvieron de la casa comercial Sigma, y se detallan en la tabla 7.

NOMBRE	GEN	SECUENCIA (5'→3')
JAZ3FwEcoR1	JAZ3	CGGAATTCGGTTCATGGAGAGAGAT
JAZ3RvPst-1	JAZ3	CCAATGCATTGGTTCTGCAGTTTTAGGTTGC
attB1_NINJA	NINJA	ggggacaagttgtacaaaaagcagcttcATGGACGATGATAATGGGCTCGAG
attB2stop_NINJA	NINJA	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctaTCAGGTGTGAGCTGACGCTGCAG
attB2sinstop_NINJA	NINJA	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctaGGTGTGAGCTGACGCTGCAG
NINJA_Fw	NINJA	ATGGACGATGATAATGGGCTCGAGCTCAGC
NINJA_Rv	NINJA	CTGGTGAGTATCCGAACATAATCGGGAGAT
attB1_JAZ5.1	JAZ5	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGTCGTCGAGCAATGAAAAT
attB2stop_JAZ5.1	JAZ5	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCctaTTCAGTGAGGTCAGCAACATCT
attB1_JAZ5.Z	JAZ5	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGTCACAGCCAGGAAGTTCGCAG
attB2stop_JAZ5.Z	JAZ5	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCctaATTATTATCAGTAGGCTCATTG

attB1_JAZ5.J	JAZ5	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCACCTAACAAAGGAACAACAAC
attB2stop_JAZ5.J	JAZ5	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATAGCCTTAGATCGAGATC
attB1_JAZ6.1	JAZ6	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCAACGGGACAAGCGCC
attB2stop_JAZ6.1	JAZ6	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCctatTCACTGAGATCAATATATA
attB1_JAZ6.Z	JAZ6	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCatgCCGGCAAAAGTAGCACCGG
attB2stop_JAZ6.Z	JAZ6	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCctagGAACTCGTTGGCTCGTTAA
attB1_JAZ6.J	JAZ6	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCatgGGGAACAATGAAGATCAAGA
attB2stop_JAZ6.J	JAZ6	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAAAGCTTGAGTTCAAGG
attB2stop_JAZ5.Zearmut	JAZ5	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCctattATTATCAGTGGCCTCATTGGCGGCAGG
attB2stop_JAZ6.Zearmut	JAZ6	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCctaggaaactgttgggcttaaggcggaat
JAZ5mutFw	JAZ5	CCTGCCGCCAATGAGGCCACTGATAATAAT
JAZ5mutFw	JAZ5	ATTATTATCAGTGGCCTCATTGGCGGCAGG
JAZ6mutRv	JAZ6	ATTGCCGCCCTTAACGCCCAACGAGTTCC
JAZ6mutRv	JAZ6	GGAACCTCGTTGGGGCGTTAAGGGCGGCAAT
attB1_COI1	COI1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGGATCCTGATATCAAGAGGTG
attB2stop_COI1	COI1	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATATTGGCTCCTCAGGACTCTAACA
attB1_JAZ3	JAZ3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGAGAGATTTTCTCGGGTTGGGTT
attB2stop_JAZ3	JAZ3	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGGTTGCAGAGCTGAGAGAAGAAC
attB1_JAZ3ΔC	JAZ3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGAGAGATTTTCTCGGGTTGGGTT
attB2stop_JAZ3ΔC	JAZ3	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTACTGTTGGAGCCATTAC
attB1_JAZ3ΔN	JAZ3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACGGTTCCTCTATGCCTCAAGT
attB2stop_JAZ3ΔN	JAZ3	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGGTTGCAGAGCTGAGAGAAGAAC
attB1_MYC2Fw	MYC2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGACTGATTACCGGTACA
attB2stop_MYC2Rv	MYC2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAACCGATTTTGTAAATC
JAZ3ΔCFw	JAZ3	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAACAGCCACCATGGAGAGAGATTTTCTCGGGTTGGGTT
JAZ3ΔCRv	JAZ3	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAACTACACTGTTGGAGCCATTAC
attB1_JAZ1	JAZ1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTGCGAGTTCTATGGAATGTTCTG
attB2stop_JAZ1	JAZ1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATATTTAGCTGTAAACCGAGCCAC
attB1_JAZ2	JAZ2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATGTGAGTTTTTCTGCCGAGTGTT
attB2stop_JAZ2	JAZ2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTTACCGTGAAGTGAAGCAAGCTGGG
attB1_JAZ4	JAZ4	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATGGAGAGAGATTTTCTCGGGCTGG
attB2stop_JAZ4	JAZ4	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAGTGCAGATGATGAGCTGGAGG
attB1_JAZ5	JAZ5	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTGTCGAGCAATGAAAATGCTA
attB2stop_JAZ5	JAZ5	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATAGCCTTAGATCGAGATCTTTTCGAA
attB1_JAZ6	JAZ6	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCAACGGGACAAGCGCCGGAGA
attB2stop_JAZ6	JAZ6	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAAAGCTTGAGTTCAAGGTTTTTGGAA
attB1_JAZ7	JAZ7	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATCATCATCAAAAACCTGCG
attB2stop_JAZ7	JAZ7	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATCGGTAACGGTGGTAAGGGGAAGTT

attB1_JAZ8	JAZ8	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATGAAGCTACAGCAAAATTGTGACT
attB2stop_JAZ8	JAZ8	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTTATCGTCGTGAATGGTACGGTGAAG
attB1_JAZ9	JAZ9	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAAGAGATTTTCTGGGTTTGA
attB2stop_JAZ9	JAZ9	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATGTAGGAGAAGTAGAAGAGTAATTC
AttB1_JAZ10	JAZ10	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTGCGAAAGCTACCATAGAACTCG
AttB2stop_JAZ10	JAZ10	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGGCCGATGTCGGATAGTAAGGAGAT
attB1_JAZ11	JAZ11	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATGGCTGAGGTAAACGGAGATTTCC
attB2stop_JAZ11	JAZ11	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATGTACAAATGGGGCTGGTTTC
attB1_JAZ12	JAZ12	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGACTAAGGTGAAAGATGAGCCAC
attB2stop_JAZ12	JAZ12	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAGCAGTTGAAATTCCTCCTTGATA
attB1_HDA6	HDA6	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC ATGGAGGCAGACGAAAGCGG
attB2stop_HDA6	HDA6	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTAAGACGATGGAGGATTCA
JAZ3 tap	JAZ3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT CCACC ATGGAGAGAGATTTTCTCGGGTTGG
JAZ5 tap	JAZ5	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT CCACC ATGTCGTCGAGCAATGAAAAATGC
JAZ7 tap	JAZ7	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT CCACCATGATCATCATCATCAAAAACCTGC
ADISA Fw		CTATTCGATGATGAAGATACCCCAACCAACCC
AD22C Fw		CTATTCGATGATGAAGATACCCC
pGADT7-RAD Rv		AGATGGTGCACGATGCACAG
promotor T7		TAATACGACTCACTATAGGG
pDONOR_Fw		TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC
pDONOR_Rv		GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC

Tabla2. Resumen de oligonucleótidos utilizados.

7. Bibliografía

- Abe, H., Urao, T.I., Seki, M., Sinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* Jan;15(1), 63-78.
- Acosta, IF. and Farmer EE. (2010). Jasmonates. *Arabidopsis Book*. 8, e0129.
- Altschul, SF., Gish, W., Miller, W., Myers, EW. and Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* Oct 215(3), 403-10.
- Andersson, M.X., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunnström, A., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Göbel, C., Feussner, I., and Ellerström, M. (2006). Oxylipin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. Formation of a novel oxo-phytodienoic acid-containing galactolipid, arabidopside E. *J Biol Chem* 20;281(42), 31528-31537.
- Arabidopsis Interactome Mapping Consortium (2011). Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map. *Science* Jul 9 333(6042).
- Austin, MJ. Muskett, P., Kahn, K., Feys, BJ., Jones, JD. and Parker, JE. (2002). Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses. *Science* Mar 295(5562), 2077-80.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. (2002). The RAR1interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* 15;295, 2073-2076.
- Bai, Y., Meng, Y., Huang, D., Qi, Y., and Chen, M. (2011). Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family. *Genomics*. Aug;98(2), 128-136.
- Balbi, V., and Devoto, A. (2008). Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol* 177, 301-318.
- Bannenberg, G., Martínez, M., Hamberg, M., and Castresana, C. (2009). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids* 44(2), 85-89.
- Bari, R., and Jones, J.D. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69(4), 473-488.
- Bell, E., and Mullet, J.E. (1993). Characterization of an Arabidopsis lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol* 103(4), 1133-1137.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate—A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* 57, 289–300.

- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., and Solano, R. (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J* 29(1), 23-31.
- Berger S., Bell E. and Mullet JE. (1996). Two Methyl Jasmonate-Insensitive Mutants Show Altered Expression of AtVsp in Response to Methyl Jasmonate and Wounding. *Plant Physiol* Jun 111(2), 525-531.
- Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* May 72, 248-54.,
- Bürckstümmer, T., Bennett, KL., Preradovic, A., Schütze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G. and Bauch, A. (2006). An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat Methods.* Dec 3(12), 1013-9.
- Bilgin, D.D., Zavala, J.A., Zhu, J., Clough, S.J., Ort, D.R., and DeLucia, E.H. (2010). Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant Cell Environ.* Oct;33(10), 1597-1613.
- De Boer, K., Tilleman, S., Pauwels, L., Vanden Bossche, R., De Sutter V., Vanderhaeghen R., Hilson P., Hamill J.D. and Goossens A. (2011). APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR and basic helix-loop-helix tobacco transcription factors cooperatively mediate jasmonate-elicited nicotine biosynthesis. *Plant J.* 2011 Jun;66(6), 1053-65.
- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A., and Prat, S. (2004). Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes Dev* 18, 1577-1591.
- Boughton, A.J., Hoover, K., and Felton, G.W. (2005). Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *J Chem Ecol.* Sep;31(9), 2211-2216.
- -Breitling, R., Armengaud, P., Amtmann, A., and Herzyk, P. (2004) Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett.* 573: 83-92.
- Brooks, D.M., Bender, C.L., and Kunkel, B.N. (2005). The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol* 6(6), 629-639.
- Brown, R.L., Kazan, K., McGrath, K.C., Maclean, D.J., and Manners, J.M. (2003). A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* Jun;132(2), 1020-1032.

- Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu Rev Plant Biol* 60, 183-205.
- Browse, J., and Howe, G.A. (2008). New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiol* 146, 832-838.
- Bruessow, F., Gouhier-Darimont, C., Buchala, A., Metraux, J.P., and Reymond, P. (2010). Insect eggs suppress plant defence against chewing herbivores. *Plant J* 62(5), 876-885.
- Bu, Q., Jiang, H., Li, C.B., Zhai, Q., Zhang, J., Wu, X., Sun, J., Xie, Q., and Li, C. (2008). Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Res* 18, 756-767.
- Bürckstümmer T, B.K., Preradovic A, Schütze G, Hantschel O, Superti-Furga G, Bauch A. (2006). An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat Methods* 3, 1013–1019.
- Calder PC. (2006). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75(3),197-202.
- Castillo, M.C., and León, J. (2008). Expression of the beta-oxidation gene 3-ketoacyl-CoA thiolase 2 (KAT2) is required for the timely onset of natural and dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 59(8), 2171-2179.
- Çevik V., Kidd BN., Zhang P., Hill C., Kiddle S., Denby KJ., Holub EB., Cahill DM., Manners JM., Schenk PM., Beynon J. and Kazan K. (2012). MEDIATOR25 acts as an integrative hub for the regulation of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* Sep 160(1), 541-55.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16, 735-743.
- Costa, C.L., Arruda, P., and Benedetti, C.E. (2000). An *Arabidopsis* gene induced by wounding functionally homologous to flavoprotein oxidoreductases. *Plant Mol Biol* 44(1), 61-71.
- Creelman, R.A., and Mullet, J.E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(10), 4114-4119.
- Cui, J., Bahrami, A.K., Pringle, E.G., Hernandez-Guzman, G., Bender, C.L., Pierce, N.E., and Ausubel, F.M. (2005). *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores 102(5), 1791-1796.
- Chen R., Jiang H., Li L., Zhai Q., Qi L., Zhou W., Liu X., Li H., Zheng W., Sun J. and Li C. (2012). The *Arabidopsis* mediator subunit MED25 differentially

regulates jasmonate and abscisic acid signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors. *Plant Cell*. Jul 24(7), 2898-916.

- Chen L., Hellmann H. (2013). Plant E3 ligases: flexible enzymes in a sessile world. *Mol Plant Sep* 6(5), 1388-404.
- Cheng, H., Song, S., Xiao, L., Soo, H.M., Cheng, Z., Xie, D., and Peng, J. (2009). Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of MYB21, MYB24, and MYB57 to promote stamen filament growth in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 5(3):e1000440.
- Cheng, Z., Sun, L., Qi, T., Zhang, B., Peng, W., Liu, Y., and Xie, D. (2011). The bHLH transcription factor MYC3 interacts with the Jasmonate ZIM-domain proteins to mediate jasmonate response in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 4(2), 279-288.
- Chico JM, Fernández-Barbero G., Chini A., Fernández-Calvo P., Díez-Díaz M. and Solano R. (2014). Repression of Jasmonate-Dependent Defenses by Shade Involves Differential Regulation of Protein Stability of MYC Transcription Factors and Their JAZ Repressors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. May 13 26(5),1967-1980.
- Chini, A., Boter, M., and Solano, R. (2009b). COI1/JAZs/MYC2: the core JA-signaling module. *FEBS Lett* 276(17),4682-4692.
- Chini, A., Fonseca, S., M., C.J., Fernandez-Calvo, P., and Solano, R. (2009a). The ZIM domain mediates homoand heteromeric interactions between *Arabidopsis* JAZ proteins. *Plant J* 59(1), 77-81.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666-671.
- Chung, H.S., and Howe, G.A. (2009). A Critical Role for the TIFY Motif in Repression of Jasmonate Signaling by a Stabilized Splice Variant of the JASMONATE ZIM-Domain Protein JAZ10 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21(1), 131-145.
- Chung, H.S., Niu, Y., Browse, J., and Howe, G.A. (2009). Top hits in contemporary JAZ: an update on jasmonate signaling. *Phytochemistry* 70, 1547-1559.
- Chung, H.S., Koo, A.J., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A.D., and Howe, G.A. (2008). Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol* 146, 952-964.
- Chung, H.S., Cooke, T.F., Depew, C.L., Patel, L.C., Ogawa, N., Kobayashi, Y., and Howe, G.A. (2010). Alternative splicing expands the repertoire of dominant JAZ repressors of jasmonate signaling. *Plant J* 63, 613- 622.

- Church, G.M., and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81, 1991-1995.
- De Boer, K., Tillemans, S., Pauwels, L., Vanden Bossche, R., De Sutter, V., Vanderhaeghen, R., Hilson, P., Hamill, J.D., and Goossens, A. (2011). APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR and basic helix-loop-helix tobacco transcription factors cooperatively mediate jasmonate-elicited nicotine biosynthesis. *Plant J* 66(6), 1053-1065.
- Deblaere R., Bytebier B., De Greve H., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M. and Leemans J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* Jul 11 13(13), 4777-88.
- Delessert, C., Kazan, K., Wilson, I.W., Van Der Straeten, D., Manners, J., Dennis, E.S., and Dolferus, R. (2005). The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*. *Plant J* Sep;43(5), 745-757.
- Delker, C., Zolman, B.K., Miersch, O., and Wasternack, C. (2007). Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* requires peroxisomal beta-oxidation enzymes--additional proof by properties of pex6 and aim1. *Phytochemistry* 68;12, 1642-1650.
- Demole, E., Lederer, E., and Mercier, D. (1962). Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta* 45, 675-685.
- Depuydt, S., and Hardtke, C.S. (2011). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr Biol*. 10;21(9), 365-373.
- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H.S., Chilcott, C., Zhu, T., and Turner, J.G. (2005). Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol Biol* 58, 497-513.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., and Turner, J.G. (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J* 32, 457-466.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 441-445.
- Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M., and Kazan, K. (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 2225-2245.

- Duplan V., Rivas S. (2014). E3 ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of plant innate immunity. *Front Plant Sci* Feb 13, 5:42.
- Durand T., Bultel-Poncé V., Guy A, Berger S., Mueller MJ., Galano JM. (2009). New bioactive oxylipins formed by non-enzymatic free-radical-catalyzed pathways: the hytoprostanes. *Lipids* Oct;44(10),875-88.
- Durrant, W.E., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol.* 42, 185-209.
- Ellis, C., and Turner, J.G. (2001). The Arabidopsis mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* May;13(5), 1025-1033.
- Erb M., Glauser G., Robert CA. (2012). Induced immunity against belowground insect herbivores- activation of defenses in the absence of a jasmonate burst. *J Chem Ecol* Jun 38(6), 629-40.
- Farmer, E.E., and Ryan, C.A. (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7713-7716.
- Farmer, E.E., and Ryan, C.A. (1992). Octadecanoid-derived signals in plants. *Trends Cell Biol.* 2(8), 236-241.
- Farmer EE. (1994). Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol Biol.* Dec 26(5), 1423-37.
- Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S.P., Wei, N., and Deng, X.W. (2003). The COP9 signalosome interacts physically with SCF COI1 and modulates jasmonate responses. *Plant Cell* 15, 1083-1094.
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J.M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., Eeckhout, D., Schweizer, F., Godoy, M., Franco-Zorrilla, J.M., Pauwels, L., Witters, E., Puga, M.I., Paz-Ares, J., Goossens, A., Reymond, P., De Jaeger, G., and Solano, R. (2011). The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* Feb;23(2), 701-715.
- Feys, B., Benedetti, C.E., Penfold, C.N., and Turner, J.G. (1994). Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* 6, 751-759.

- Fields S. and Song O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. 1989 20 340(6230), 245-6.
- Figueroa P. and Browse J. (2015). Male sterility in *Arabidopsis* induced by overexpression of a MYC5-SRDX chimeric repressor. *Plant J Mar* (6), 849-60.
- Fonseca, S., Chico, J.M., and Solano, R. (2009b). The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Curr Opin Plant Biol* 12, 539-547.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., and Solano, R. (2009a). (-)-7-iso-Jasmonoyl-L-Isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*.
- Fonseca S., Fernández-Calvo P, Fernández GM, Díez-Díaz M, Gimenez-Ibanez S, López-Vidriero I, Godoy M, Fernández-Barbero G, Van Leene J, De Jaeger G, Franco-Zorrilla JM and Solano R. (2014). bHLH003, bHLH013 and bHLH017 are new targets of JAZ repressors negatively regulating JA responses. *PLoS One Jan* 23, 9(1):e86182.
- Footitt, S., Dietrich, D., Fait, A., Fernie, A.R., Holdsworth, M.J., Baker, A., and Theodoulou, F.L. (2007). The COMATOSE ATP-binding cassette transporter is required for full fertility in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 144(3), 1467-1480.
- Franco-Zorrilla JM., López-Vidriero I., Carrasco J.L., Godoy M., Vera P. and Solano R. (2014). DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A Feb* 11 111(6), 2367-72.
- Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M. (2000). *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell Mar*;12(3), 393-404.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* 9, 436-442. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 20;99(17):11519-24.
- Gagne JM., Downes BP., Shiu SH., Durski AM., Vierstra RD. (2002) The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17), 11519-24.
- Gangappa, S.N., Prasad, V.B., and Chattopadhyay, S. (2010). Functional interconnection of MYC2 and SPA1 in the photomorphogenic seedling development of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 154(3), 1210-1219.

- Garcia, M.E., Lynch, T., Peeters, J., Snowden, C., and Finkelstein, R. (2008). A small plant-specific protein family of ABI five binding proteins (AFPs) regulates stress response in germinating Arabidopsis seeds and seedlings. *Plant Mol Biol* Aug;67(6), 643-658.
- Gfeller, A., Dubugnon, L., Liechti, R., and Farmer, E.E. (2010). Jasmonate biochemical pathway. *Sci Signal* 16;3(109).
- Gidda SK., Miersch O., Levitin A., Schmidt J., Wasternack C., Varin L. (2003). Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem*. May 16;278(20), 17895-900.
- Glauser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E.E., and Wolfender, J.L. (2008). Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in Arabidopsis in response to wounding. *J Biol Chem* 283, 16400-16407.
- -Godoy, M., Franco-Zorrilla, J.M., Pérez-Pérez, J., Oliveros, J.C., Lorenzo, O., and Solano, R. (2011). Improved protein-binding microarrays for the identification of DNA-binding specificities of transcription factors. *Plant J* 66(4), 700-711.
- Goossens A., Häkkinen ST., Laakso I., Oksman-Caldentey KM. and Inzé D. (2003). Secretion of secondary metabolites by ATP-binding cassette transporters in plant cell suspension cultures. *Plant Physiol* Mar 131(3), 1161-4.
- Gray, W.M., Muskett, P.R., Chuang, H.W., and Parker, J.E. (2003). Arabidopsis SGT1b is required for SCF(TIR1)-mediated auxin response. *Plant Cell* 15, 1310-1319.
- Guerineau, F., Benjdia, M., and Zhou, D.X. (2003). A jasmonate-responsive element within the A. thaliana vsp1 promoter. *J Exp Bot* Apr;54(385), 1153-1162.
- Guranowski, A., Miersch, O., Staswick, P.E., Suza, W., and Wasternack, C. (2007). Substrate specificity and products of side-reactions catalyzed by jasmonate:amino acid synthetase (JAR1). *FEBS Lett* 581, 815-820.
- Hamberg, M., and Gardner, H.W. (1992). Oxylin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance. *Biochim Biophys Acta* 1165, 1-18.
- Hammarström M., Hellgren N., van Den Berg S., Berglund H. and Härd T. (2002). Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in Escherichia coli. *Protein Sci*. 2002 Feb;11(2):313-21.

- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* Jun 5 166(4), 557-80.
- Heim MA., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B., Bailey PC. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. (2003). *Mol Biol Evol* May 20(5), 735-47.
- Heitz T., Widemann E., Lugan R., Miesch L., Ullmann P., Désaubry L., Holder E., Grausem B., Kandel S., Miesch M., Werck-Reichhart D., Pinot F. (2012). Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 catalyze two successive oxidation steps of plant hormone Jasmonoyl-isoleucine for catabolic turnover. *J Biol Chem* Feb 287(9), 6296-306.
- Hettenhausen C., Schuman MC. and Wu J. (2015). MAPK signaling: a key element in plant defense response to insects. *Insect Sci* Apr 22(2), 157-64.
- Hill K., Wang H. and Perry SE. (2008). A transcriptional repression motif in the MADS factor AGL15 is involved in recruitment of histone deacetylase complex components. *Plant J* Jan 53(1), :172-85.
- Hind, S.R., Pulliam, S.E., Veronese, P., Shantharaj, D., Nazir, A., Jacobs, N.S., and Stratmann, J.W. (2011). The COP9 signalosome controls jasmonic acid synthesis and plant responses to herbivory and pathogens. *Plant J* 65(3), 480-491.
- Hiratsu K., Matsui K., Koyama T. and Ohme-Takagi M. (2003). Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J* Jun 34(5), 733-9.
- Hiruma K., Nishiuchi T., Kato T., Bednarek P., Okuno T., Schulze-Lefert P. and Takano Y. (2011). *Arabidopsis* ENHANCED DISEASE RESISTANCE 1 is required for pathogen-induced expression of plant defensins in nonhost resistance, and acts through interference of MYC2-mediated repressor function. *Plant J* Sep 67(6), 980-92.
- Hou, X., Lee, L.Y., Xia, K., Yan, Y., and Yu, H. (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev Cell*. Dec 14;19(6), 884-894.
- Howe, G.A., and Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol.* 59, 41-66.
- Huang MD., Wu WL. (2007). Overexpression of TMAC2, a novel negative regulator of abscisic acid and salinity responses, has pleiotropic effects in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 63, 557–569
- Hyun, Y., Choi, S., Hwang, H.J., Yu, J., Nam, S.J., Ko, J., Park, J.Y., Seo, Y.S., Kim, E.Y., Ryu, S.B., Kim, W.T., Lee, Y.H., Kang, H., and Lee, I. (2008).

Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. *Dev Cell* 14(2), 183-192.

- Irigoyen ML., Iniesto E., Rodriguez L., Puga M.I., Yanagawa Y., Pick E., Strickland E., Paz-Ares J., Wei N., De Jaeger G., Rodriguez P.L., Deng X.W., Rubio V. (2014). Targeted degradation of abscisic acid receptors is mediated by the ubiquitin ligase substrate adaptor DDA1 in Arabidopsis. *Plant Cell*. Feb 26(2), 712-28.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., and Okada, K. (2001). The DEFECTIVE IN ANTHR DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 2191-2209.
- Ito H., Fukuda Y., Murata K. and Kimura A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* Jan 153(1), 163-8.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.
- Jones JD., Dangl JL. (2006). The plant immune system. *Nature* Nov 444(7117), 323-9.
- Kachroo A, Kachroo P. (2009). Fatty Acid-derived signals in plant defense. *Annu Rev Phytopathol.* 47 153-76.
- Kagale S., Links M.G. and Rozwadowski K. (2010). Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in Arabidopsis. *Plant Physiol* Mar 152(3), 1109-34.
- Katsir, L., Schilmiller, A.L., Staswick, P.E., He S.Y. and Howe, G.A. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105,7100-7105.
- Kawamura, Y., Takenaka, S., Hase, S., Kubota, M., Ichinose, Y., Kanayama, Y., Nakaho, K., Klessig, D.F., and Takahashi, H. (2009). Enhanced defense responses in Arabidopsis induced by the cell wall protein fractions from *Pythium oligandrum* require SGT1, RAR1, NPR1 and JAR1. *Plant Cell Physiol* 50(5),924-934.
- Kazan, K., and Manners, J.M. (2008). Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiol* 146,1459-1468.
- Kazan K. and Manners JM. (2013). MYC2: the master in action. *Mol Plant* May 6(3), 686-703.

- Kazan K. (2015). Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends Plant Sci* Apr 20(4), 219-229.
- Kepinski, S., and Leyser, O. (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 446-451.
- Kidd BN., Aitken EA., Schenk PM., Manners JM., Kazan K. (2010). Plant mediator: mediating the jasmonate response. *Plant Signal Behav* Jun 5(6), 718-20.
- Kim, S.R., Kim, Y., and An, G. (1993). Identification of methyl jasmonate and salicylic acid response elements from the nopaline synthase (nos) promoter. *Plant Physiol Sep*;103(1), 97-103. *Mol Cell*. 1999 Jul;4(1):21-33.
- Kitagawa K., Skowyra D., Elledge SJ., Harper JW., Hieter P. (1999). SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Mol Cell* Jul 4(1), 21-33.
- Kitaoka N., Matsubara T., Sato M., Takahashi K., Wakuta S., Kawaide H., Matsui H., Nabeta K., Matsuura H. (2011). Arabidopsis CYP94B3 encodes jasmonyl-L-isoleucine 12-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of jasmonate. *Plant Cell Physiol* Oct 52(10), 1757-65.
- Kloeck, A.P., Verbsky, M.L., Sharma, S.B., Schoelz, J.E., Vogel, J., Klessig, D.F., and Kunkel, B.N. (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an Arabidopsis thaliana coronatine-insensitive (coi1) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J* 26, 509-522.
- Koo, A.J., and Howe, G.A. (2007). Role of Peroxisomal beta-Oxidation in the Production of Plant Signaling Compounds. *Plant Signal Behav* 2(1), 20-22.
- Koo, A.J., Cooke, T.F., and Howe, G.A. (2011). Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 31;108(22), 9298-9303.
- Koo AJ., Thireault C., Zemelis S., Poudel AN., Zhang T., Kitaoka N., Brandizzi F., Matsuura H., Howe GA.. (2014). Endoplasmic reticulum-associated inactivation of the hormone jasmonoyl-L-isoleucine by multiple members of the cytochrome P450 94 family in Arabidopsis. *J Biol Chem*. Oct 289(43), 29728-38.
- Kourtchenko, O., Andersson, M.X., Hamberg, M., Brunnström, A., Göbel, C., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Feussner, I., and Ellerström, M. (2007). Oxo-phytodienoic acid-containing galactolipids in Arabidopsis: jasmonate signaling dependence. *Plant Physiol* 145(4), 1658-1669.

- Krogan NT., Hogan K. and Long JA. (2012). APETALA2 negatively regulates multiple floral organ identity genes in Arabidopsis by recruiting the co-repressor TOPLESS and the histone deacetylase HDA19. *Development* Nov 139(22), 4180-90.
- Laudert, D., and Weiler, E.W. (1998). Allene oxide synthase: a major control point in Arabidopsis thaliana octadecanoid signalling. *Plant J* 15(5), 675-684.
- Laudert, D., Pfannschmidt, U., Lottspeich, F., Holländer-Czytko, H., and Weiler, E.W. (1996). Cloning, molecular and functional characterization of Arabidopsis thaliana allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol Biol* 31(2), 323-335.
- Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I.H., and Kunkel, B.N. (2006). The Arabidopsis thaliana JASMONATE INSENSITIVE 1 gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by Pseudomonas syringae. *Mol Plant Microbe Interact* 19, 789-800.
- Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T., and Genschik, P. (2006). F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol* Dec;9(6), 631-638.
- León-Reyes, A., Van der Does, D., De Lange, E.S., Delker, C., Wasternack, C., Van Wees, S.C., Ritsema, T., and Pieterse, C.M. (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway *Planta* 232(6), 1423-1432.
- .Leyser, H.M., Lincoln, C.A., Timpote, C., Lammer, D., Turner, J., and Estelle, M. (1993). Arabidopsis auxinresistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* 364(6433), 161-164.
- Li, J., Brader, G., and Palva, E.T. (2004a). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16, 319-331.
- Li, J., Brader, G., Kariola, T., and Palva, E.T. (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J* May;46(3), 477-491.
- -Li, L., Zhao, Y., McCaig, B.C., Wingerd, B.A., Wang, J., Whalon, M.E., Pichersky, E., and Howe, G.A. (2004b). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* 16, 126-143.
- Loake, G., and Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* 10(5), 466-447.
- Logemann J., Schell J. and Willmitzer L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem.* May 163(1), 16-20.

- Long, J.A., Ohno, C., Smith, Z.R., and Meyerowitz, E.M. (2006). TOPLESS regulates apical embryonic fate in *Arabidopsis*. *Science* 9;316(5779), 1520-1523.
- Long, J.A., Woody, S., Poethig, S., Meyerowitz, E.M., and Barton, M.K. (2002). Transformation of shoots into roots in *Arabidopsis* embryos mutant at the TOPLESS locus. *Development* 129(12), 2797-2806.
- Lopez-Molina L., Mongrand S., Kinoshita N. and Chua NH. (2003). AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes Dev* Feb 17(3), 410-8.
- Lorenzo, O., and Solano, R. (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* 8, 532-540.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15, 165-178.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 1938-1950.
- Mandaokar, A., and Browse, J. (2009). MYB108 Acts Together with MYB24 to Regulate Jasmonate-Mediated Stamen Maturation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149, 851-862.
- Mandaokar, A., Kumar, V.D., Amway, M., and Browse, J. (2003). Microarray and differential display identify genes involved in jasmonate-dependent anther development. *Plant Mol Biol* 52(4), 775-786.
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Lange, B.M., Choi, G., Koo, Y.J., Yoo, Y.J., Choi, Y.D., and Browse, J. (2006). Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *Plant J* 46, 984-1008.
- Marino D., Peeters N., Rivas S. (2012). Ubiquitination during plant immune signaling. *Plant Physiol* Sep 160(1), 15-27.
- Mazzucotelli E., Belloni S., Marone D., De Leonardis A., Guerra D., Di Fonzo N., Cattivelli L., Mastrangelo A. (2006). The e3 ubiquitin ligase gene family in plants: regulation by degradation. *Curr Genomics* 7(8), 509-22.
- McConn, M., and Browse, J. (1996). The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an *Arabidopsis* Mutant. *Plant Cell* 8(3), 403-416.

- McGrath, K.C., Dombrecht, B., Manners, J.M., Schenk, P.M., Edgar, C.I., Maclean, D.J., Scheible, W.R., Udvardi, M.K., and Kazan, K. (2005). Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiol* 139, 949-959.
- Melan, M.A., Dong, X., Endara, M.E., Davis, K.R., Ausubel, F.M., and Peterman, T.K. (1993). An Arabidopsis thaliana lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol* 101(2), 441-450.
- Meldau, S., Baldwin, I.T., and Wu, J. (2011). SGT1 regulates wounding- and herbivory-induced jasmonic acid accumulation and *Nicotiana attenuata*'s resistance to the specialist lepidopteran herbivore *Manduca sexta*. *New Phytol* 189(4), 1143-1156.
- Melotto, M., Mecey, C., Niu, Y., Chung, H.S., Katsir, L., Yao, J., Zeng, W., Thines, B., Staswick, P., Browse, J., Howe, G.A., and He, S.Y. (2008). A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant J* 55, 979-988.
- Memelink, J. (2009). Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* Sep;70(13-14), 1560-1570.
- Méndez-Bravo A., Calderón-Vázquez C., Ibarra-Laclette E., Raya-González J., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J., Guevara-García AA., López-Bucio J., Herrera-Estrella L. (2011). Alkamides activate jasmonic acid biosynthesis and signaling pathways and confer resistance to *Botrytis cinerea* in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* 6(11).
- Menke, F.L., Champion, A., Kijne, J.W., and Memelink, J. (1999). A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J* Aug 16;18(16), 4455-4463.
- Miersch, O., and Wasternack, C. (2000). Octadecanoid and jasmonate signaling in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves: endogenous jasmonates do not induce jasmonate biosynthesis. *Biol Chem* 381(8), 751-722.
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I., and Wasternack, C. (2008). Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol* 177, 114-127.
- Moon J., Parry G., Estelle M. (2004) The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell* Dec16(12), 3181-95.

- Mosblech, A., Thurow, C., Gatz, C., Feussner, I., and Heilmann, I. (2011). Jasmonic acid perception by COI1 involves inositol polyphosphates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 65;(6), 949-957.
- Mueller, M.J., Brodschelm, W., Spannagl, E., and Zenk, M.H. (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 15;90(16), 7490-7494.
- Nagpal, P., Ellis, C.M., Weber, H., Ploense, S.E., Barkawi, L.S., Guilfoyle, T.J., Hagen, G., Alonso, J.M., Cohen, J.D., Farmer, E.E., Ecker, J.R., and Reed, J.W. (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* 132(18), 4107-4118.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., K., M., Jinbo, T., and Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* 104, 31-41.
- Nakata M. and Ohme-Takagi M. (2013). Two bHLH-type transcription factors, JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE2 and JAM3, are transcriptional repressors and affect male fertility. *Plant Signal Behav* 8(12):e26473.
- Niu, Y., Figueroa, P., and Browse, J. (2011). Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 62(6), 2143-2154.
- Nishii A., Takemura M., Fujita H., Shikata M., Yokota A. and Kohchi T. (2000). Characterization of a novel gene encoding a putative single zinc-finger protein, ZIM, expressed during the reproductive phase in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* Jul 64(7), 1402-9.
- Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethyleneresponsive element. *Plant Cell* Feb;7(2), 173-182.
- Ohta M., Matsui K., Hiratsu K., Shinshi H. and Ohme-Takagi M. (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* Aug 13(8), 1959-68.
- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., and Feyereisen, R. (2002a). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J* Jul;31(1), 1-12.
- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., and Feyereisen, R. (2002b). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J* 31(1), 1-12.

- Pauwels, L., Inze, D., and Goossens, A. (2009). Jasmonate-inducible gene: What does it mean? *Trends Plant Sci* 14, 87-91.
- Pauwels, L., Morreel, K., De Witte, E., Lammertyn, F., Van Montagu, M., Boerjan, W., Inze, D., and Goossens, A. (2008). Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1380-1385.
- Pauwels, L., Barbero, G.F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Perez, A.C., Chico, J.M., Bossche, R.V., Sewell, J., Gil, E., Garcia-Casado, G., Witters, E., Inze, D., Long, J.A., De Jaeger, G., Solano, R., and Goossens, A. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* 464, 788-791.
- Payne, C.T., Zhang, F., and Lloyd, A.M. (2000). GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics* Nov;156(3), 1349-1362.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Métraux, J.P., and Broekaert, W.F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10(12), 2103-2113.
- Pieterse CM., Van der Does D., Zamioudis C., Leon-Reyes A., Van Wees SC. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28, 489-521.
- Pozo, J.C., Timpte, C., Tan, S., Callis, J., and Estelle, M. (1998). The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. *Science* 12;280(5370), 1760-1763.
- Pozo, M.J., Van Der Ent, S., Van Loon, L.C., and Pieterse, C.M. (2008). Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 180(2), 511-523.
- Pozo J.C., Manzano C. (2014). Auxin and the ubiquitin pathway. Two players-one target: the cell cycle in action. *J Exp Bot* Jun 65(10), 2617-32.
- Pre, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse C.M.J. and Memelink, J. (2008). The AP2/ERF transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol* 147(3), 1347-1357.
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., Fan, M., Peng, W., Ren, C., and Xie, D. (2011). The Jasmonate-ZIM-Domain Proteins Interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB Complexes to Regulate Jasmonate-Mediated Anthocyanin Accumulation and Trichome Initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23(5), 1798-1814.

- Rayapuram, C., and Baldwin, I.T. (2006). Using nutritional indices to study LOX3-dependent insect resistance. *Plant Cell Environ* 29(8), 1585-1594.
- Reinbothe, C., Springer, A., Samol, I., and Reinbothe, S. (2009). Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *FEBS J* 276, 4666-4681.
- Ren, C., Pan, J., Peng, W., Genschik, P., Hobbie, L., Hellmann, H., Estelle, M., Gao, B., Peng, J., Sun, C., and Xie, D. (2005). Point mutations in Arabidopsis Cullin1 reveal its essential role in jasmonate response. *Plant J* 42, 514-524.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R.M., Krishnamurthy, V., Dicke, M., and Farmer, E.E. (2004). A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell* 16, 3132-3147.
- Rojo, E., Titarenko, E., León, J., Berger, S., Vancanneyt, G., and Sánchez-Serrano, J.J. (1998). Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 13(2), 153-165.
- Rose AB. and Broach JR. (1990). Propagation and expression of cloned genes in yeast: 2-microns circle-based vectors. *Methods Enzymol* 185, 234-79.
- Salehin M., Bagchi R., Estelle M. (2015). SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. *Plant Cell Jan* 27(1), 9-19.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanders, P.M., Lee, P.Y., Biesgen, C., Boone, J.D., Beals, T.P., Weiler, E.W., and Goldberg, R.B. (2000). The arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* 12(7), 1041-1061.
- Sasaki-Sekimoto Y., Jikumaru Y., Obayashi T., Saito H., Masuda S., Kamiya Y., Ohta H. and Shirasu K. (2013). Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in Arabidopsis. *Plant Physiol Sep* 163(1), 291-304.
- Schaller, F., and Weiler, E.W. (1997). Molecular cloning and characterization of 12-oxophytodienoate reductase, an enzyme of the octadecanoid signaling pathway from *Arabidopsis thaliana*. Structural and functional relationship to yeast old yellow enzyme. *J Biol Chem* 31;272(44), 28066-28072.

- Scharf M., Schneider R., Casari G., Bork P., Valencia A., Ouzounis C. and Sander C. (1994). GeneQuiz: a workbench for sequence analysis. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 2, 348-53.
- Schilmiller, A.L., Koo, A.J., and Howe, G.A. (2007). Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. *Plant Physiol* 143(2), 812-844.
- Schulze B¹, Lauchli R, Sonwa MM, Schmidt A, Boland W. (2006). Profiling of structurally labile oxylipins in plants by in situ derivatization with pentafluorobenzyl hydroxylamine. *Anal Biochem.* Jan 15 348(2), 269-83.
- Schweighofer, A., and Meskiene, I. (2008). Regulation of stress hormones jasmonates and ethylene by MAPK pathways in plants. *Mol Biosyst* 4(8), 799-803.
- Schweizer F., Fernández-Calvo P., Zander M., Diez-Diaz M., Fonseca S., Glauser G., Lewsey MG., Ecker JR., Solano R., Reymond P. (2013). Arabidopsis basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell* Aug 25(8), 3117-32.
- Sheard LB, T.X., Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1- JAZ co-receptor. *Nature* 18(468), 400-405.
- Shen H., Zhu L., Bu Q.Y., Huq E. (2012). MAX2 affects multiple hormones to promote photomorphogenesis. *Mol Plant.* May 5(3), 750-62.
- Shikata, M., Matsuda, Y., Ando, K., Nishii, A., Takemura, M., Yokota, A., and Kohchi, T. (2004). Characterization of Arabidopsis ZIM, a member of a novel plant-specific GATA factor gene family. *J Exp Bot* 55, 631- 639.
- Shoji T. and Hashimoto T. (2014). Stress-induced expression of NICOTINE2-locus genes and their homologs encoding Ethylene Response Factor transcription factors in tobacco. *Phytochemistry* Jun (14) 00228-3.
- -Shyu C., Figueroa P., Depew CL., Cooke TF., Sheard LB., Moreno JE., Katsir L., Zheng N., Browse J. and Howe GA. (2012). JAZ8 lacks a canonical degron and has an EAR motif that mediates transcriptional repression of jasmonate responses in Arabidopsis. *Plant Cell* Feb 24(2), 536-50.
- Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, Article3.

- Solano R., Stepanova A., Chao Q., Ecker JR. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev* Dec 12(23), 3703-14.
- Song S., Qi T., Fan M., Zhang X., Gao H., Huang H., Wu D., Guo H. and Xie D. (2013). The bHLH subgroup IIIId factors negatively regulate jasmonate-mediated plant defense and development. *PLoS Genet* 9(7):e1003653.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., Liu, Y., Peng, J., and Xie, D. (2011). The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect Jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23(3), 1000-1013.
- Staswick, P.E., and Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2117-2127.
- Staswick P. (2009). Plant hormone conjugation: a signal decision. *Plant Signal Behav.* Aug 4(8), 757-9.
- Steppuhn, A., Schuman, M.C., Baldwin, I.T. (2008). Silencing jasmonate signalling and jasmonate-mediated defences reveals different survival strategies between two *Nicotiana attenuata* accessions. *Mol Ecol* 17(16), 3717-3732.
- Stenzel I., Hause B., Miersch O., Kurz T., Maucher H., Weichert H., Ziegler J., Feussner I., Wasternack C. (2003). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* Apr 51(6), 895-911.
- Stintzi, A., and Browse, J. (2000). The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 12;97(19), 10625-10630.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., and Farmer, E.E. (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12837-12842.
- Stone SL., Hauksdóttir H., Troy A., Herschleb J., Kraft E., Callis J. (2005). Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* Jan 137(1), 13-30.
- Stone SL. (2014). The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling. *Front Plant Sci* Apr 16, 5:135.
- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U.B., Howe, G.A., Weiler, E.W., Amrhein, N., Macheroux, P., and Schaller, A. (2002). Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles

for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant J* 32(4), 585-601.

- Suza, W.P., and Staswick, P.E. (2008). The role of JAR1 in Jasmonoyl-L: -isoleucine production during Arabidopsis wound response. *Planta* 227(6), 1221-1232.
- Suza, W.P., Rowe, M.L., Hamberg, M., and Staswick, P.E. (2010). A tomato enzyme synthesizes (-)-7-isojasmonoyl-L-isoleucine in wounded leaves. *Planta* 231, 717-728.
- Swain, T., and Hillis, W.E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 10, 63-68.
- Szemenyei, H., Hannon, M., and Long, J.A. (2008). TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science* 319, 1384-1386.
- Tabata, R., Ikezaki, M., Fujibe, T., Aida, M., Tian, C.E., Ueno, Y., Yamamoto, K.T., Machida, Y., Nakamura, K., and Ishiguro, S. (2010). Arabidopsis auxin response factor6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 KNOX genes. *Plant Cell Physiol* 51(1), 164-175.
- Takahashi, F., Yoshida, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Seo, S., Yonezawa, M., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2007). The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 19(3), 805-818.
- Takahashi, N., Kuroda, H., Kuromori, T., Hirayama, T., Seki, M., Shinozaki, K., Shimada, H., and Matsui, M. (2004). Expression and interaction analysis of Arabidopsis Skp1-related genes. *Plant Cell Physiol* 45(1), 83-91.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., M., E., and Zheng, N. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 640-645.
- Thaler JS., Humphrey PT., Whiteman NK. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci* May 17(5), 260-70.
- Theodoulou, F.L., Job, K., Slocombe, S.P., Footitt, S., Holdsworth, M., Baker, A., Larson, T.R., and Graham, I.A. (2005). Jasmonic Acid Levels Are Reduced in COMATOSE ATP-Binding Cassette Transporter Mutants. Implications for Transport of Jasmonate Precursors into Peroxisomes. *Plant Physiol* 137, 835-840.

- Thijs G., Lescot M., Marchal K., Rombauts S., De Moor B., Rouzé P., Moreau Y. (2001). A higher-order background model improves the detection of promoter regulatory elements by Gibbs sampling. *Bioinformatics*. Dec 17(12), 1113-22.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* 448, 661-665.
- Tiriyaki, I., and Staswick, P.E. (2002). An Arabidopsis mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. *Plant Physiol* 130, 887-894.
- Toledo-Ortiz G., Huq E. and Quail PH. (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell*. Aug 15(8),1749-70.
- Trujillo M., Shirasu K. (2010). Ubiquitination in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* Aug 13(4),402-8.
- Uppalapati, S.R., Ishiga, Y., Ryu, C.M., Ishiga, T., Wang, K., Noël, L.D., Parker, J.E., and Mysore, K.S. (2011). SGT1 contributes to coronatine signaling and *Pseudomonas syringae* pv. tomato disease symptom development in tomato and Arabidopsis. *New Phytol* 189(1), 83-93.
- Van der Does D., Leon-Reyes A., Koornneef A., Van Verk MC., Rodenburg N., Pauwels L., Goossens A., Körbes AP., Memelink J., Ritsema T., Van Wees SC., Pieterse CM. (2013). Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCOI1-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *Plant Cell* Feb 25(2), 744-61.
- Van Leene, J., Witters, E., Inzé, D., De Jaeger G. (2008). Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. *Trends Plant Sci* 13, 517–520.
- Vanholme, B., Grunewald, W., Bateman, A., Kohchi, T., and Gheysen, G. (2007). The tify family previously known as ZIM. *Trends Plant Sci* 12, 239-244.
- van Verk MC., Bol JF., Linthorst HJ. (2011). Prospecting for genes involved in transcriptional regulation of plant defenses, a bioinformatics approach. *BMC Plant Biol* May 19, 11:88.
- Vick, B.A., and Zimmerman, D.C. (1983). The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 16;111(22), 470-477.
- Vierstra RD. (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Jun10(6), 385-97.

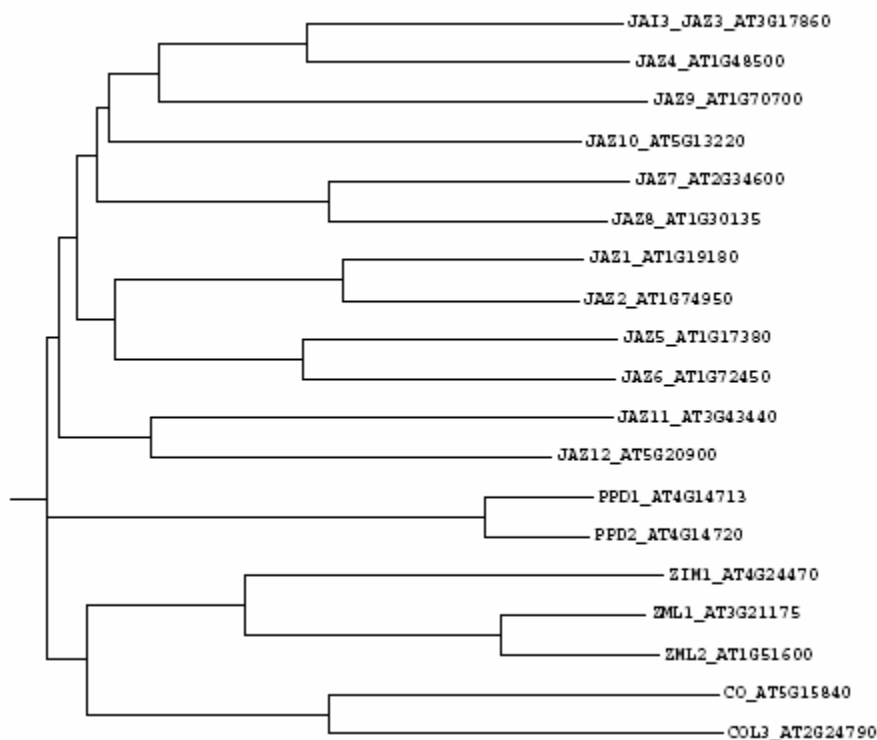
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C.A., Cook, R.J., and Browse, J. (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(12), 7209-7214.
- von Malek, B., van der Graaff, E., Schneitz, K., and Keller, B. (2002). The Arabidopsis male-sterile mutant dde2-2 is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta* 216(1), 187-192.
- Wang D., Dubois RN. Eicosanoids and cancer. (2010) *Nat Rev Cancer*. 10(3), 181-93.
- Wang, Z., Cao, G., Wang, X., Miao, J., Liu, X., Chen, Z., Qu, L.J., and Gu, H. (2008). Identification and characterization of COI1-dependent transcription factor genes involved in JA-mediated response to wounding in Arabidopsis plants. *Plant Cell Rep* 27, 125-135.
- Wang F., Deng XW. (2011). Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling. *Cell Res Sep* 21(9), 1286-94.
- Wang L., Kim J. and Somers DE. (2013). Transcriptional corepressor TOPLESS complexes with pseudoresponse regulator proteins and histone deacetylases to regulate circadian transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan (2), 761-6.
- Wasternack, C., and Kombrink, E. (2010). Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chem Biol* 5, 63-77.
- Wasternack C, Hause B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. (2013). *Ann Bot*. Jun;111(6),1021-58.
- White, D.W. (2006). PEAPOD regulates lamina size and curvature in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13238-13243.
- Widemann E., Miesch L., Lugan R., Holder E., Heinrich C. Aubert Y., Miesch M., Pinot F., Heitz T. (2013). The amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in Arabidopsis leaves. *J Biol Chem*. Nov 288(44), 31701-14.
- Woldemariam MG., Onkokesung N., Baldwin IT., Galis I. (2012). Jasmonoyl-L-isoleucine hydrolase 1 (JIH1) regulates jasmonoyl-L-isoleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. *Plant J*. Dec 72(5), 758-67.

- Wu, K., Zhang, L., Zhou, C., Yu, C.W., and Chaikam, V. (2008). HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 59(2), 225-234.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G. (1998). COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280, 1091-1094.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., and Xie, D. (2002). The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 1919-1935.
- Yadav, V., Mallappa, C., Gangappa, S.N., Bhatia, S., and Chattopadhyay, S. (2005). A basic helix-loop-helix transcription factor in *Arabidopsis*, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *Plant Cell* 17, 1953-1966.
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., and Xie, D. (2009). The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* 21, 2220-2236.
- Yan, Y., Stolz, S., Chetelat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., and Farmer, E.E. (2007). A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* 19, 2470-2483.
- Yang, Z., Tian, L., Latoszek-Green, M., Brown, D., and Wu, K. (2005). *Arabidopsis* ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Mol Biol* 58(4), 585-596.
- Yang DL., Yao J., Mei CS., Tong XH., Zeng LJ., Li Q., Xiao LT., Sun TP., Li J., Deng XW., Lee CM., Thomashow M.F., Yang Y., He Z., He SY. (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 8 109(19), E1192-200.
- Yee D., Goring DR. (2009). The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. *J Exp Bot* 60(4), 1109-21.
- Yoshida, Y., Sano, R., Wada, T., Takabayashi, J., and Okada, K. (2009). Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in *Arabidopsis*. *Development* 136, 1039-1048.
- Zander, M., La Camera, S., Lamotte, O., Métraux, J.P., and Gatz, C. (2010). *Arabidopsis thaliana* class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses. *Plant J* 61(2), 200-210.

- Zarei, A., Körbes, A.P., Younessi, P., Montiel, G., Champion, A., and Memelink, J. (2011). Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the PDF1.2 promoter in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 75(4-5), 321-331.
- Zhai Q., Yan L., Tan D., Chen R., Sun J., Gao L., Dong MQ., Wang Y. and Li C. (2013). Phosphorylation-coupled proteolysis of the transcription factor MYC2 is important for jasmonate-signaled plant immunity. *PLoS Genet.* Apr 9(4), e1003422.
- Zhang, F., Gonzalez, A., Zhao, M., Payne, C.T., and Lloyd, A. (2003). A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis. *Development* Oct;130(20), 4859-4869.
- Zhang, Y., and Turner, J.G. (2008). Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLoS ONE* 3(11), e3699.
- Zhao S. and Qi X. (2008). Signaling in plant disease resistance and symbiosis. *J Integr Plant Biol.* Jul 50(7), 799-807.
- Zhao, M., Morohashi, K., Hatlestad, G., Grotewold, E., and Lloyd, A. (2008). The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. *Development* Jun;135(11), 1991-1999.
- -Zhu Z., An F., Feng Y., Li P., Xue L., A M, Jiang Z., Kim JM., To TK., Li W., Zhang X., Yu Q., Dong Z., Chen WQ., Seki M., Zhou JM., Guo H. (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* Jul 108(30), 12539-44.
- Zhu Z. (2014). Molecular basis for jasmonate and ethylene signal interactions in Arabidopsis. *J Exp Bot.* Nov 65(20), 5743-8.
- Zolman BK., Silva ID., Bartel B. (2001). The Arabidopsis pxa1 mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Physiol.* Nov 127(3), 1266-78.

8. Apéndice

a



b

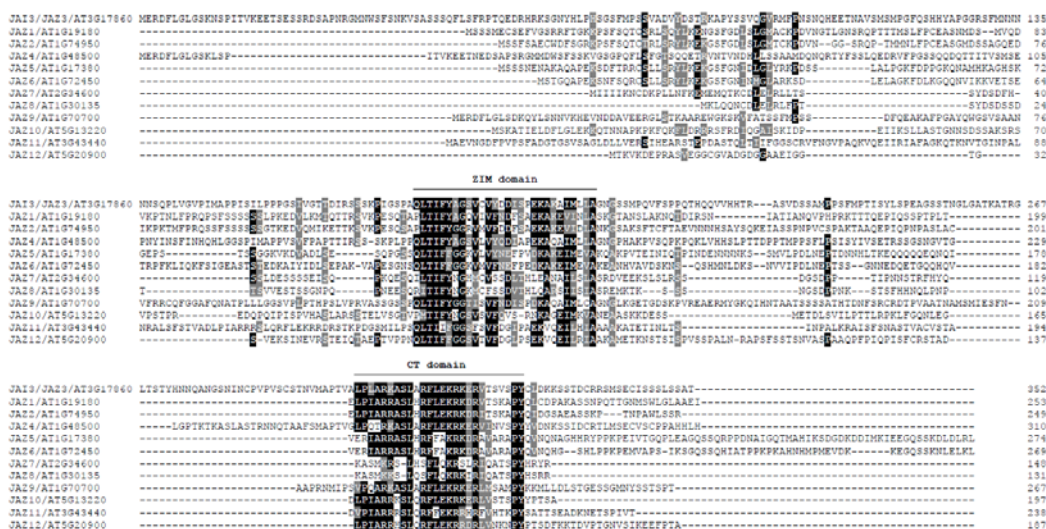
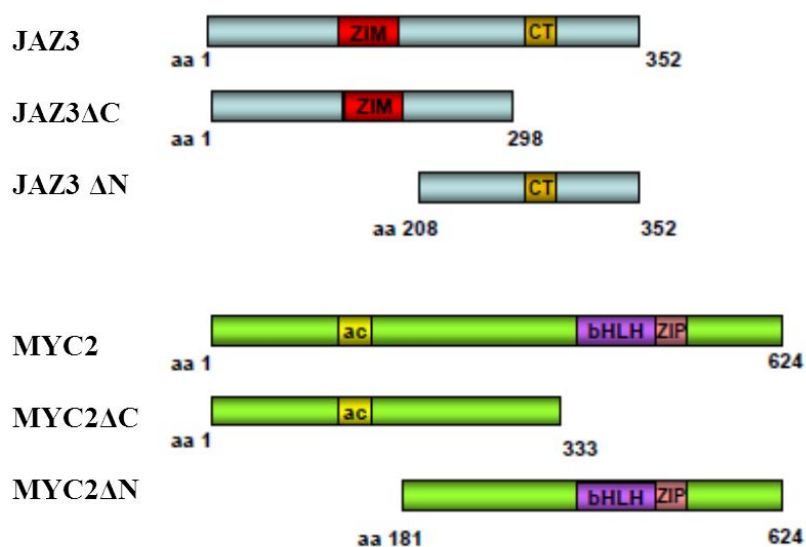


Figura suplementaria 1. Familia de proteínas JAZ. a. Representación filogenética de las proteínas de la familia JAZ y otros miembros de la familia TIFY. b. Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de los 12 miembros de la familia JAZ. Los residuos conservados en al menos la mitad de las proteínas están resaltados en negro, y aquellos con sustitución de aminoácido conservativa en gris. Se ha resaltado el dominio ZIM y el Jas dentro de la estructura con una línea superior. El alineamiento fue generado usando DiAlign (Genomatix).

a



b

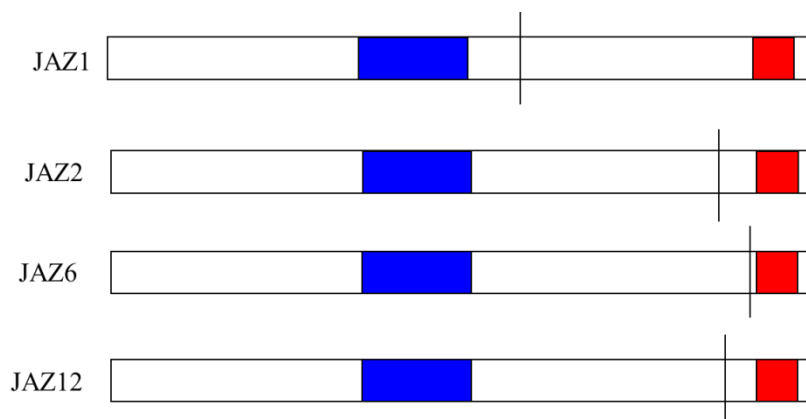


Figura suplementaria 2. Representación esquemática de las proteínas truncadas JAZ1, JAZ2, JAZ3, JAZ6, JAZ12 y MYC2. **a.** Proteínas JAZ3 y MYC2, así como los distintos fragmentos usados en experimentos de PD y doble híbrido en levadura. El fragmento JAZ3ΔC también se usó para generar plantas transgénicas. Se resaltan los dominios ZIM, CT o dominio Jas, BHLH, ZIP y la región “ac” que representa una región rica en aminoácidos ácidos. Los oligos usados para generar estas construcciones se muestran en la tabla 2. **b.** Proteínas JAZsΔJas que se usaron para generar plantas transgénicas fusionadas al epítipo HA.

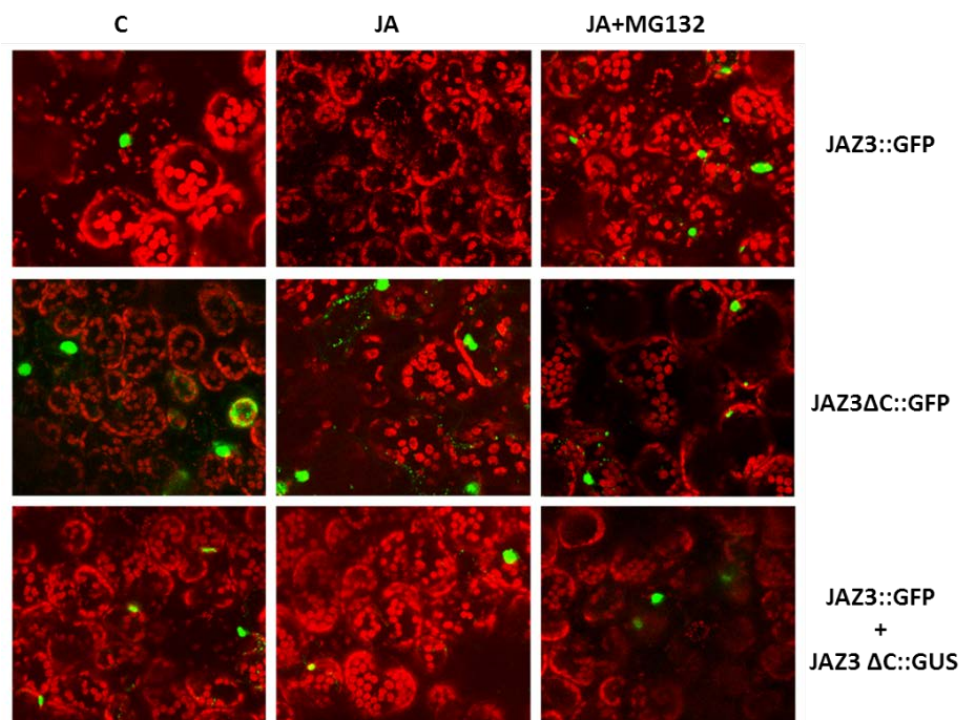


Figura suplementaria 3. Prevención de la degradación de JAZ3 por JAZ3ΔJas mediada por el proteasoma. Expresión transitoria de JAZ3::GFP, JAZ3ΔC::GFP y JAZ3ΔC::GUS en hojas de *Nicotiana benthamiana* en condiciones control (C) o tratadas con JA 50 μM JA o inhibidor del proteasoma MG132 100 μM.

Tabla suplementaria 1. Genes diferencialmente expresados en plantas *jai3-1* vs Col-0. También se incluyen los valores de plantas *35S::MYC2*.

Down-regulated genes											
Name	ProbeID	A (j <i>ai</i> 3-1.2hJA)	M (j <i>ai</i> 3-1.2hJA)	A (j <i>ai</i> 3-1.6hJA)	M (j <i>ai</i> 3-1.6hJA)	p value (j <i>ai</i> 3-JA)	FDR (j <i>ai</i> 3-JA)	A (3S <i>SA</i> MYC2)	M (3S <i>SA</i> MYC2)	p value (3S <i>SA</i> MYC2)	FDR (3S <i>SA</i> MYC2)
At1g45015	A002468_01	10.14	-0.21	9.61	-0.64	0.00021251	0.0861598	7.91	0.3	0.02034838	0.08622183
At4g15100	A300019346	8.07	-0.18	9.52	-0.69	0.00022644	0.08942849	7.89	0.01	0.86423318	0.93033033
At3g22250	A009281_01	7.75	-0.5	7.11	-0.34	0.00000209	0.004664	7.06	0.47	0.00073356	0.01182068
At3g17860	A300014068	10.62	-0.55	9.59	-0.28	0.00000328	0.00575932	9.28	0.59	0.01500046	0.07063975
At4g37400	A014198_01	8.52	-0.66	8.21	-0.35	0.000001	0.004664	8.2	0.69	0.00223357	0.00661303
At4g37710	A015295_01	7.75	-0.61	7.4	-0.62	0.00000188	0.004664	6.92	0.41	0.00559153	0.05330142
At1g52040	A003844_01	10.18	-0.44	11.11	-0.59	0.00023823	0.09064548	7.94	0.53	0.06461722	0.18624436
At4g37850	A015553_01	8.38	-0.4	7.9	-0.59	0.0000055	0.00750965	7.3	0.63	0.0027021	0.00707494
At5g04120	A016193_01	9.1	-0.46	8.47	-0.6	0.0000203	0.01863064	7.66	0.65	0.00014237	0.00522406
At1g66280	A300005849	11.74	-0.24	12.18	-0.54	0.00004316	0.03284339	10.58	2.44	0.00000002	0.00048417
At3g09940	A011469_01	14.29	-0.43	13.18	-0.55	0.00020285	0.08500309	10.19	1.71	0.00009575	0.00434573
At4g21830	A020381_01	13.25	-0.46	12.18	-0.69	0.00000441	0.00855479	10.61	1.96	0.00000472	0.00144646
At4g22210	A020390_01	10.44	-0.27	11.73	-0.62	0.00001075	0.01242422	10.24	1.47	0.00017683	0.00585416
At4g22610	A020175_01	11.39	-0.44	11.55	-0.79	0.00004626	0.03284339	9.91	2.08	0.000000274	0.00133632
At4g22230	A00200169	11.56	-0.27	12.25	-0.62	0.00018766	0.08246299	11.27	1.41	0.00040448	0.00846665
At4g29650	A022511_01	9.42	-0.33	9.31	-0.58	0.00001285	0.01432353	8.2	1.63	0.00008426	0.00406882
At2g24850	A00872_01	13.03	-0.5	12.02	-0.39	0.00017191	0.00779197	11.2	1.6	0.00004512	0.00317587
At5g13220	A30023561	11.41	-0.52	10.57	-0.51	0.00000207	0.004664	9.35	2.41	0.00000945	0.00187382
At2g26370	A008875_01	9.27	-0.34	10.03	-1	0.00016355	0.07731379	7.84	1.46	0.00095155	0.01376489
At3g61400	A009913_01	9.66	-0.29	9.39	-0.58	0.00000554	0.00750965	8.56	1.06	0.00244238	0.00677144
At2g01880	A021105_01	11.28	-0.35	10.48	-0.66	0.00001684	0.007306	10.39	1.1	0.00037359	0.00820152
At5g09980	A018418_01	10.26	-0.32	10.01	-0.51	0.00002645	0.02357701	8.86	0.9	0.00441257	0.03266633
At1g52120	A30004488	9.46	-0.55	9.26	-0.47	0.00000152	0.004664	7.7	0.96	0.00075112	0.01203038
At2g14610	A022124_01	11.3	-0.94	9.96	-1.31	0.00009569	0.05331433	14.31	2.1	0.00000451	0.00143017
At4g21840	A30020122	10.82	-0.56	10.05	-0.8	0.00000132	0.004664	9.12	1.33	0.0009325	0.01364173
At1g17190	A003828_01	12.16	-0.41	11.41	-0.73	0.00000101	0.004664	10.75	0.97	0.000119746	0.00612001
At2g34350	A020442_01	9.2	-0.41	8.4	-0.6	0.00000332	0.00575932	7.66	0.86	0.00005663	0.00353501
At5g19520	A022693_01	10	-0.61	9.38	-0.91	0.0000042	0.00855479	8.17	1.29	0.00018849	0.00554315
At2g18210	A007546_01	10.61	-0.75	10.07	-0.92	0.00000005	0.00153532	9.41	1.42	0.00169783	0.018894
At5g22555	A020813_01	8.01	-0.6	8.07	-0.73	0.00000591	0.00766601	9.02	1.04	0.00032171	0.007645
Up-regulated genes											
Name	ProbeID	A (j <i>ai</i> 3-1.2hJA)	M (j <i>ai</i> 3-1.2hJA)	A (j <i>ai</i> 3-1.6hJA)	M (j <i>ai</i> 3-1.6hJA)	p value (j <i>ai</i> 3-JA)	FDR (j <i>ai</i> 3-JA)	A (3S <i>SA</i> MYC2)	M (3S <i>SA</i> MYC2)	p value (3S <i>SA</i> MYC2)	FDR (3S <i>SA</i> MYC2)
At2g41810	A023349_01	9.07	0.53	8.51	0.41	0.00003178	0.02650821	8.82	-0.41	0.00536738	0.048426
At3g50640	A009807_01	8.89	0.42	8.41	0.63	0.00001933	0.0182349	9.58	-1.27	0.00227905	0.0072127
At5g14630	A007416_01	10.6	0.4	8.81	0.53	0.00023774	0.09064548	9.5	-0.06	0.6636869	0.8142496

Down-regulated genes

Name	Description
At1g45015	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein / ML domain-containing protein contains Pfam profile PF02221 ML domain
At4g15100	serine carboxypeptidase S10 family protein similar to Serine carboxypeptidase II chains A and B (SPP08819) (EC 3.4.166) [Triticum aestivum (Wheat)]
At3g22250	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein contains Pfam profile PF00201 UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase expressed protein
At3g17860	cytochrome P450 family protein similar to cytochrome P450 monooxygenase CYP51A2 Arabidopsis thaliana D78607
At4g37400	V/Q motif-containing protein contains PF05678 VQ motif
At4g37710	jacalin lectin family protein nearly identical to myrosinase-binding protein homolog G1297767 from [Arabidopsis thaliana] contains Pfam profile PF01419 jacalin-like lectin domain identical to cDNA myrosinase-binding protein homolog G1297766
At1g52040	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein contains Pfam profile PF00010 helix-loop-helix DNA-binding domain
At4g37850	phosphoglycerate:bisphosphoglycerate mutase family protein low similarity to SPIP36623 Phosphoglycerate mutase (EC 5.4.21) [Schizosaccharomyces pombe] contains Pfam profile PF00300 phosphoglycerate mutase family
At5g04120	glycosyl hydrolase family 1 protein contains Pfam PF00232 Glycosyl hydrolase family 1 domain TIGRFAM TIGR01233 6-phospho-beta-galactosidase similar to beta-glucosidase 1 (G112043529) [Arabidopsis thaliana]
At1g66280	monodehydroascorbate reductase putative similar to monodehydroascorbate reductase (NADH) GBJU0182 (Cucumis sativus)
At3g09940	methionine sulfoxide reductase domain-containing protein / SRR domain-containing protein low similarity to plant-like transcription factor [Homo sapiens] G1050902 SPIP14300 pyridoxal methionine sulfoxide reductase msrAmsrB (EC 1.8.40) [Nesaea guineensis] contains Pfam profile PF01641 SRR domain
At4g21830	hypothetical protein
At4g22210	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein contains Pfam protease inhibitor/seed storage/LTP family domain PF00234
At4g22610	expressed protein
At4g22230	type I phosphodiesterase/nucleoside pyrophosphatase family protein similar to SPIP22413 5'-nucleoside pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (Pharma cell membrane glycoprotein PC-1) [Bradyrhizobium japonicum] contains Pfam profile PF01663 Type I phosphodiesterase
At4g29690	aminotransferase putative similar to nicotianamine aminotransferase from Hordeum vulgare [G1498122 G1498087] contains Pfam profile PF00155 aminotransferase classes I and II
At2g24850	expressed protein
At5g13220	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein / ML domain-containing protein contains Pfam profile PF02221 ML domain
At2g26370	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase putative similar to 2A6 [G1595622] and tomato ethylene synthesis regulatory protein E8 (SPIP10957) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog - Arabidopsis thaliana PIR59548
At3g61400	purple acid phosphatase (PAP7) identical to purple acid phosphatase (PAP7) G120257476 from [Arabidopsis thaliana] contains Pfam profile PF00149 calcineurin-like phosphoesterase
At2g01880	expressed protein
At5g09980	jacalin lectin family protein similar to myrosinase-binding protein homolog [Arabidopsis thaliana] G1297767 contains Pfam profile PF01419 jacalin-like lectin domain
At1g52120	pathogenesis-related protein 1 (PR-1) identical to GBM90508 SPIP33154
At2g14610	methionine sulfoxide reductase domain-containing protein / SRR domain-containing protein weak similarity to plant-like transcription factor [Homo sapiens] G1050902 SPIP14300 Peptide methionine sulfoxide reductase msrAmsrB (EC 1.8.40) [Nesaea guineensis] contains Pfam profile PF01641 SRR domain
At4g21840	glutathione S-transferase putative One of three repeated glutathione transferases 65% identical to glutathione transferase [Arabidopsis thaliana] [G14006934] Location of est 141C517 (gb 146669) supported by fl cDNA gi 14326476gb AF385691
At1g17190	nodulin-related weak similarity to nodule-specific protein N170 [Lotus japonicus] G13329366
At2g34350	mechanosensitive ion channel domain-containing protein / MS ion channel domain-containing protein contains Pfam profile PF00524 Mechanosensitive ion channel
At5g19520	expressed protein
At2g18210	expressed protein
At5g22555	expressed protein

Up-regulated genes

Name	Description
At2g41810	expressed protein contains Pfam profile PF04862 Protein of unknown function DUF642
At3g50640	expressed protein
At5g14650	polylacturonase putative / pectinase putative similar to polylacturonase PG1 G15656946 PG2 G15656948 from [Glycine max] contains PF00295 Glycosyl hydrolases family 28 (polylacturonases)

Tabla suplementaria 2. Genes diferencialmente expresados en ARNi *NINJA* vs Col-0.

AT1G06620	1,18	0,003 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase
AT1G14250	1,59	0,001 nucleoside phosphatase family protein
AT1G18710	1,44	0,001 AtMYB47
AT1G19670	1,14	0,005 ATCLH1 (CORONATINE-INDUCED PROTEIN 1)
AT1G24070	1,09	0,014 ATCSLA10 (Cellulose synthase-like A10)
AT1G52000	2,1	0,000 jacalin lectin family protein [AT1G52000.1]
AT1G52030	1,79	0,000 MBP2 (MYROSINASE-BINDING PROTEIN 2)
AT1G52040	2,12	0,000 MBP1 (MYROSINASE-BINDING PROTEIN 1)
AT1G52400	2,66	0,000 BGL1 (BETA-GLUCOSIDASE HOMOLOG 1)
AT1G52410	1,88	0,000 TSA1 (TSK-ASSOCIATING PROTEIN 1)
AT1G52890	1,14	0,006 ANAC019 (Arabidopsis NAC domain containing protein 19)
AT1G53480	3,72	0,000 unknown protein
AT1G54010	1,64	0,000 myrosinase-associated protein
AT1G54020	2,3	0,000 myrosinase-associated protein
AT1G61120	1,33	0,001 terpene synthase/cyclase family protein
AT1G62660	1,06	0,024 beta-fructosidase (BFRUCT3)
AT1G72120	1,09	0,007 transporter
AT1G73325	1,19	0,002 trypsin and protease inhibitor family protein
AT1G80120	1,12	0,005 unknown protein
AT2G02990	1,06	0,025 RNS1 (RIBONUCLEASE 1)
AT2G16367	1,98	0,000 Defensin-like (DEFL) family protein
AT2G24850	1,02	0,004 TAT3 (TYROSINE AMINOTRANSFERASE 3)
AT2G26010	2,36	0,000 PDF1.3 (plant defensin 1.3)
AT2G26020	2,17	0,000 PDF1.2b (plant defensin 1.2b)
AT2G34600	2,24	0,000 JAZ7/TIFY5B
AT2G36080	1,06	0,013 DNA-binding protein
AT2G37620	1,15	0,004 ACT1 (ACTIN 1)
AT2G38240	1,33	0,001 oxidoreductase
AT2G39030	2,51	0,000 GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT)
AT2G43510	1,31	0,003 ATTI1 (ARABIDOPSIS THALIANA TRYPSIN INHIBITOR PROTEIN 1)
AT2G44578	1,5	0,000 protein binding / zinc ion binding
AT3G01345	4,18	0,000 Expressed protein [AT3G01345.1]
AT3G04720	1,02	0,041 PR4 (PATHOGENESIS-RELATED 4)
AT3G11480	1,09	0,006 BSMT1; S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase
AT3G12145	1,19	0,003 FLR1 (FLOR1)
AT3G16470	1,03	0,019 JASMONATE RESPONSIVE 1
AT3G25760	1,46	0,001 AOC1 (ALLENE OXIDE CYCLASE 1)
AT3G25770	1,02	0,017 AOC2 (ALLENE OXIDE CYCLASE 2)
AT3G28220	2,36	0,000 meprin and TRAF homology domain-containing protein
AT3G28270	1,38	0,001 UPF0496 protein
AT3G42658	1,51	0,000 transposable element gene
AT3G51450	1,07	0,009 strictosidine synthase family protein
AT3G54990	1,18	0,002 SMZ (SCHLAFMUTZE)
AT3G55970	1,55	0,001 oxidoreductase
AT4G02360	1,01	0,017 unknown protein
AT4G04223	1,08	0,027 unknown
AT4G07812	1,83	0,000 unknown pseudogene
AT4G11290	1,02	0,009 peroxidase
AT4G11320	1,81	0,000 cysteine proteinase
AT4G12480	1,41	0,001 pEARLI 1
AT4G12490	1,64	0,001 lipid transfer protein (LTP) family protein
AT4G12500	1,53	0,001 lipid transfer protein (LTP) family protein
AT4G15610	1,01	0,041 Integral membrane family protein
AT4G16590	1,26	0,005 ATCSLA01 (Cellulose synthase-like A1)
AT4G27860	1,24	0,004 integral membrane family protein [AT4G27860.1]
AT5G05600	2,13	0,000 oxidoreductase

AT5G10300	1,01	0,024 hydrolase
AT5G13220	1,5	0,000 JAS1/JAZ10/TIFY9
AT5G24420	1,55	0,000 glucosamine/galactosamine-6-phosphate isomerase-related
AT5G24770	1,3	0,001 VSP2 (VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2)
AT5G24780	1,75	0,001 VSP1 (VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1)
AT5G26270	1,05	0,019 unknown protein
AT5G44420	1,95	0,000 PDF1.2
AT5G44430	2,48	0,000 PDF1.2c (
AT5G47220	1,05	0,025 ATERF-2/ATERF2/ERF2 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 2)
AT5G63970	1,03	0,008 copine-related
AT5G67080	1,01	0,039 MAPKKK19
CO048493	1,6	0,000 cDNA clone tk49b11
<hr/>		
AT1G35230	-1,03	0,028 AGP5 (ARABINOGLACTAN-PROTEIN 5)
AT4G15110	-1,07	0,084 CYP97B3
AT5G35935	-1,15	0,024 transposable element gene
ATCG00840	-1,2	0,129 chloroplast ribosomal protein L23
AT5G35935	-1,29	0,017 transposable element gene
ATCG00070	-1,7	0,013 PSII K protein
AT4G28910	-1,76	0,000 NINJA (RNAi target)

¹False discovery rate (FDR) corrected RankProduct p-value < 0.05 and logFC >1 or <-1

²Arabidopsis Genome Initiative identifier, loci in bold are used in this order for figure 1e

³log Fold Change of the means of four biological replicated experiments

⁴False discovery rate (FDR) corrected RankProduct p-value

Tabla suplementaria 3. Genes diferencialmente expresados en ARNi *NINJA* vs Col-0 tratados con COR 0,5µM.

Gene	log2	P value	Gene
AT1G02920	1,12	0,042	ATGSTF7 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 11)
AT1G06620	13	0,009	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase
AT1G07930	1,59	0,015	elongation factor 1-alpha
AT1G14120	1,74	0,001	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase
AT1G14240	1,71	0,001	nucleoside phosphatase family protein
AT1G14250	1,19	0,042	nucleoside phosphatase family protein
AT1G15520	1,56	0,009	ATPDR12 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 12)
AT1G15670	1,59	0,001	kelch repeat-containing F-box family protein
AT1G17380	18	0,008	JAZ5/TIFY11A
AT1G17420	2,11	0,000	LOX3 (Lipoxygenase 3)
AT1G18710	2,16	0,000	AtMYB47
AT1G19680	1	0,050	protein binding / zinc ion binding
AT1G24070	1,31	0,008	ATCSLA10 (Cellulose synthase-like A10)
AT1G30135	1,31	0,011	JAZ8/TIFY5A
AT1G33960	1,58	0,015	AIG1 (AVRRPT2-INDUCED GENE 1)
AT1G35230	11	0,017	AGP5 (ARABINOGLACTAN-PROTEIN 5)
AT1G35580	19	0,018	CINV1 (CYTOSOLIC INVERTASE 1)
AT1G52000	2,57	0,000	jacalin lectin family protein [AT1G52000.1]
AT1G52030	1,89	0,000	MBP2 (MYROSINASE-BINDING PROTEIN 2)
AT1G52040	2,47	0,000	MBP1 (MYROSINASE-BINDING PROTEIN 1)
AT1G52380	1,1	0,015	Ran-binding protein 1 domain-containing protein
AT1G52400	1,81	0,001	BGL1 (BETA-GLUCOSIDASE HOMOLOG 1)
AT1G52410	1,46	0,004	TSA1 (TSK-ASSOCIATING PROTEIN 1)
AT1G53480	3,08	0,000	unknown protein
AT1G54000	1,59	0,004	myrosinase-associated protein
AT1G54010	1,33	0,006	myrosinase-associated protein
AT1G54020	29	0,000	myrosinase-associated protein
AT1G54030	1,41	0,004	GDSL-motif lipase
AT1G55490	1,02	0,032	CPN60B (CHAPERONIN 60 BETA)
AT1G58270	1,36	0,008	ZW9
AT1G61120	21	0,000	terpene synthase/cyclase family protein
AT1G61800	1,56	0,006	GPT2 (glucose-6-phosphate/phosphate translocator 2)
AT1G64160	1,3	0,006	disease resistance-responsive family protein
AT1G68620	11	0,049	hydrolase
AT1G72260	1,7	0,001	THI2.1 (THIONIN 2.1)
AT1G72450	1,16	0,021	JAZ6/TIFY11B (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 6)
AT1G79690	1,04	0,023	ATNUDT3 (Arabidopsis thaliana Nudix hydrolase homolog 3)
AT1G80110	1,02	0,050	ARABIDOPSIS THALIANA PHLOEM PROTEIN 2-B11 (ATPP2-B11)
AT2G01450	1,3	0,049	ATMPK17 (Arabidopsis thaliana MAP kinase 17)
AT2G03980	1,41	0,004	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein
AT2G13810	1,44	0,031	ALD1 (AGD2-LIKE DEFENSE RESPONSE PROTEIN1)
AT2G15760	1,63	0,004	calmodulin-binding protein
AT2G16367	1,86	0,001	Defensin-like (DEFL) family protein
AT2G16720	1,44	0,004	MYB7 (myb domain protein 7)

AT2G17500	2,08	0,000 auxin efflux carrier family protein
AT2G18690	15	0,030 unknown protein
AT2G20340	1,45	0,004 tyrosine decarboxylase
AT2G22200	1,12	0,024 AP2 domain-containing transcription factor
AT2G22330	1,1	0,030 CYP79B3 (cytochrome P450, family 79, subfamily B, polypeptide 3)
AT2G22770	1,32	0,015 NAI1; bHLH transcription factor
AT2G24850	1,58	0,008 TAT3 (TYROSINE AMINOTRANSFERASE 3)
AT2G25450	1,34	0,010 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase
AT2G26560	1,01	0,025 PLP2 (PHOSPHOLIPASE A 2A)
AT2G27690	1,09	0,039 CYP94C1 (cytochrome P450, family 94, subfamily C, polypeptide 1)
AT2G29350	1,54	0,008 SAG13 (senescence-associated gene 13)
AT2G29440	1,49	0,004 ATGSTU6 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 24)
AT2G29460	1,67	0,001 ATGSTU4 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 22)
AT2G30720	1,13	0,012 thioesterase family protein
AT2G30770	1,48	0,008 CYP71A13
AT2G30830	1,14	0,027 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase
AT2G30950	1,32	0,017 VAR2 (VARIEGATED 2)
AT2G33070	1,42	0,006 jacalin lectin family protein
AT2G34600	12	0,019 JAZ7/TIFY5B
AT2G37025	1,02	0,027 TRFL8 (TRF-LIKE 8)
AT2G37620	1,38	0,009 ACT1 (ACTIN 1)
AT2G38240	1,03	0,048 oxidoreductase
AT2G39330	12	0,031 jacalin lectin family protein
AT2G39770	1,36	0,017 CYT1 (CYTOKINESIS DEFECTIVE 1)
AT2G46680	1,06	0,017 ATHB-7 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN 7)
AT3G01345	3,84	0,000 Expressed protein [AT3G01345.1]
AT3G09940	1,99	0,000 ATMDAR3/MDHAR (MONODEHYDROASCORBATE REDUCTASE)
AT3G09950	1,39	0,007 unknown protein
AT3G11340	2,06	0,000 UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
AT3G11480	2,57	0,000 BSMT1; S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase
AT3G12145	1,3	0,009 FLR1 (FLOR1)
AT3G14310	1,4	0,027 ATPME3 (Arabidopsis thaliana pectin methylesterase 3)
AT3G15500	11	0,017 ATNAC3 (ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 55)
AT3G15730	1,31	0,024 PLDALPHA1 (PHOSPHOLIPASE D ALPHA 1)
AT3G15950	16	0,006 TSA1-LIKE
AT3G16400	1,96	0,000 ATMLP-470 (MYROSINASE-BINDING PROTEIN-LIKE PROTEIN-470)
AT3G16420	1,11	0,022 PBP1 (PYK10-BINDING PROTEIN 1)
AT3G16460	1,08	0,022 jacalin lectin family protein
AT3G16470	2,08	0,000 JASMONATE RESPONSIVE 1
AT3G20370	1,07	0,024 meprin and TRAF homology domain-containing protein
AT3G22160	1,17	0,021 VQ motif-containing protein
AT3G22275	2,33	0,000 unknown protein
AT3G22740	1,58	0,004 HMT3 (Homocysteine S-methyltransferase 3)
AT3G25180	1,59	0,005 CYP82G1
AT3G26330	13	0,017 CYP71B37
AT3G26830	1,64	0,004 PAD3 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 3)
AT3G26840	12	0,008 esterase/lipase/thioesterase family protein

AT3G27415	2,03	0,000 unknown protein
AT3G27809	1	0,011 unknown protein
AT3G28220	1,32	0,009 meprin and TRAF homology domain-containing protein
AT3G28270	22	0,000 UPF0496 protein
AT3G28290	1,73	0,001 AT14A
AT3G42658	1,5	0,008 transposable element gene
AT3G45130	1,46	0,004 LAS1 (Lanosterol synthase 1)
AT3G45140	1,87	0,006 LOX2 (LIPOXYGENASE 2)
AT3G47340	1,51	0,005 ASN1 (DARK INDUCIBLE 6)
AT3G50480	12	0,046 HR4 (HOMOLOG OF RPW8 4)
AT3G50930	1,17	0,019 AAA-type ATPase family protein
AT3G54990	1,46	0,005 SMZ (SCHLAFMUTZE)
AT3G56200	16	0,031 short-chain dehydrogenase/reductase
AT3G57260	1,16	0,049 BGL2 (PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 2)
AT3G59970	1,48	0,017 MTHFR1 (METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE 1)
AT4G03400	1	0,009 DFL2 (DWARF IN LIGHT 2)
AT4G03420	18	0,009 unknown protein
AT4G04840	1,39	0,008 methionine sulfoxide reductase domain-containing protein
AT4G07812	1,79	0,001 unknown pseudogene
AT4G10500	1,39	0,047 oxidoreductase
AT4G11310	1,18	0,028 cysteine proteinase
AT4G11320	1,61	0,003 cysteine proteinase
AT4G14365	1,16	0,025 zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
AT4G16730	1,4	0,005 lyase/ magnesium ion binding
AT4G17500	1,51	0,004 ATERF-1 (ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 1)
AT4G18950	1,3	0,019 ankyrin protein kinase
AT4G21830	1,93	0,000 METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE B7 (ATMSRB7)
AT4G21840	1,7	0,004 methionine sulfoxide reductase domain-containing protein
AT4G21910	1,19	0,013 MATE efflux family protein
AT4G23420	1,1	0,017 short-chain dehydrogenase/reductase
AT4G23600	1,06	0,049 COR13 (CORONATINE INDUCED 1, JASMONIC ACID RESPONSIVE 2)
AT4G24190	1,58	0,006 SHD (SHEPHERD)
AT4G25780	1,06	0,032 pathogenesis-related protein
AT4G27860	1,42	0,006 integral membrane family protein [AT4G27860.1]
AT4G30270	1,04	0,031 MER15B (MERISTEM-5)
AT4G31500	18	0,009 CYP83B1
AT4G33050	1,18	0,009 EDA39
AT4G36950	15	0,017 O-methyltransferase family 2 protein
AT4G37990	1,56	0,003 MAPKKK21
AT4G39030	1,14	0,039 EDS5 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5)
AT5G01900	1,41	0,008 WRKY62 (WRKY DNA-binding protein 62)
AT5G02500	1,64	0,025 heat shock cognate 70 kDa protein 1
AT5G02940	16	0,010 phosphotransferase-related
AT5G04590	1,06	0,047 SIR (sulfite reductase)
AT5G07350	1,03	0,017 tudor domain-containing protein
AT5G09440	1,1	0,024 phosphate-responsive protein
AT5G12340	1,32	0,010 unknown protein

AT5G13220	1,8	0,000 JAS1/JAZ10/TIFY9
AT5G13320	1,55	0,019 PBS3 (AVRPPHB SUSCEPTIBLE 3)
AT5G17990	1,45	0,005 TRP1 (TRYPTOPHAN BIOSYNTHESIS 1)
AT5G22630	1,52	0,006 ADT5 (AROGENATE DEHYDRATASE 5)
AT5G24420	1,64	0,001 glucosamine/galactosamine-6-phosphate isomerase-related
AT5G25250	1,11	0,033 VSP2 (VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2)
AT5G26270	1,03	0,047 unknown protein
AT5G27380	1,4	0,031 GSH2/GSHB (GLUTATHIONE SYNTHETASE 2)
AT5G28237	1,06	0,041 tryptophan synthase
AT5G28540	1,04	0,040 BIP1 (LUMINAL BINDING PROTEIN)
AT5G41120	1,03	0,025 esterase/lipase/thioesterase family protein
AT5G42020	1,08	0,031 BIP (LUMINAL BINDING PROTEIN)
AT5G43745	1,63	0,003 phosphotransferase-related
AT5G47220	1,11	0,019 ATERF-2/ATERF2/ERF2 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 2)
AT5G51070	15	0,030 ERD1 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 1)
AT5G60890	1	0,018 ATMYB34/ATR1/MYB34
AT5G61790	1,08	0,032 calnexin 1 (CNX1)
AT5G61890	2,38	0,000 AP2 domain-containing transcription factor
AT5G63450	17	0,009 CYP94B1
AT5G63970	1,71	0,001 copine-related
AT5G65380	1,53	0,005 ripening-responsive protein
AT5G67080	28	0,000 MAPKKK19
ATCG00070	1,15	0,013 PSII K protein
ATCG00640	1,04	0,041 chloroplast ribosomal protein L33
ATCG00650	1,01	0,010 chloroplast ribosomal protein S18
ATCG00770	1,33	0,012 chloroplast ribosomal protein S8
ATCG00810	1,18	0,030 chloroplast ribosomal protein L22
BP839700	1,44	0,030 cDNA clone RAFL22-27-O05
CO048493	1,51	0,004 cDNA clone tk49b11
H36258	1,49	0,006 Cysteine proteinase At4g11320 precursor
N37480	1,02	0,016 ADP glucose pyrophosphorylase small subunit
AK119050	-1,03	0,019 Arabidopsis thaliana mRNA for unknown protein
AT1G07490	-1,03	0,027 DVL9/RTFL3 (ROTUNDIFOLIA LIKE 3)
AT1G15405	-1,02	0,018 other RNA [AT1G15405.1]
AT1G17090	-1,05	0,021 unknown protein
AT1G22160	-1,02	0,019 senescence-associated protein-related
AT1G54580	-1,05	0,019 ACP2 (ACYL CARRIER PROTEIN 2)
AT1G56650	-1,02	0,019 PAP1 (PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1)
AT2G04110	-1,16	0,004 pseudogene of unknown protein
AT2G37950	-1,08	0,010 zinc finger (C3HC4-type RING finger)
AT3G25597	-1,08	0,003 unknown protein
AT3G55290	-1,05	0,015 short-chain dehydrogenase/reductase
AT4G10290	-1,85	0,000 unknown protein
AT4G11911	-1,14	0,005 similar to ATNYE1/NYE1 (NON-YELLOWING 1)
AT4G15110	-18	0,002 CYP97B3
AT4G15210	-17	0,002 ATBETA-AMY (BETA-AMYLASE)

AT4G21870	-1,01	0,040 heat shock protein (HSP26.5-P)
AT4G28910	-2,65	0,000 NINJA (RNAi target)
AT4G29610	-1,47	0,000 cytidine deaminase
AT4G35160	-12	0,004 O-methyltransferase family 2 protein
AT5G02380	-1,12	0,002 MT2B (METALLOTHIONEIN 2B)
AT5G17220	-1,65	0,000 ATGSTF12 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 26)
AT5G35935	-1,4	0,002 transposable element gene
AT5G41761	-1,1	0,013 unknown protein
AT5G49525	-1,17	0,003 unknown protein
AT5G58310	-1,01	0,022 hydrolase
AT5G63500	-1,15	0,002 unknown protein
AY090965	-1,46	0,000 unknown

¹False discovery rate (FDR) corrected RankProduct p-value < 0.05 and logFC >1 or <-1

²Arabidopsis Genome Initiative identifier, loci in bold are used in this order for figure S7

³log Fold Change of the means of four biological replicated experiments

⁴False discovery rate (FDR) corrected RankProduct p-value

9. Artículos relacionados con esta tesis

